



**BIODIVERSIDADE DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE GRÃOS DE
CAFÉ DE CULTIVO ORGÂNICO E
CONVENCIONAL**

FABIANA APARECIDA COUTO

2010

FABIANA APARECIDA COUTO

**BIODIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE
GRÃOS DE CAFÉ DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Couto, Fabiana Aparecida.

Biodiversidade de fungos filamentosos isolados de grãos de café
de cultivo orgânico e convencional / Fabiana Aparecida Couto. –
Lavras : UFLA, 2010.

81 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luis Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Microorganismos. 2. Sistema de cultivo. 3. Microbiota. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7394

FABIANA APARECIDA COUTO

**BIODIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE
GRÃOS DE CAFÉ DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2010

Pesq. Dr. Rodrigo Luz da Cunha

EPAMIG

Prof. Dr. Marcelo Ângelo Cirillo

UFLA

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Nilton e Aparecida.
Aos meus irmãos, Rodrigo, Daniela e Fernanda.

DEDICO TODO O MEU TRABALHO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades que tive em minha vida, pela proteção e amparo nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus pais, Nilton e Aparecida, que se mostraram como verdadeiros heróis. Eles formaram uma grande família e conseguiram educar de maneira exemplar todos os filhos. Suas histórias são marcadas por sacrifícios e distâncias, mas o amor que sentiam e ainda sentem um pelo outro é mais forte do que qualquer dificuldade que possa surgir.

Aos meus irmãos, Rodrigo, Daniela e Fernanda, que se esforçaram e persistiram em seus estudos e mostraram que este é o melhor caminho.

Aos meus grandes amigos, Elizabete e Wilson, que sempre me apoiaram e fizeram diferença em minha vida. E ao grande responsável pela minha descoberta da Biologia, Mardem, que sempre me ensinou o quanto o estudo da vida era fascinante! Obrigada por continuarem a me amar, mesmo na minha ausência.

Aos meus tios Aurélio e Adelina, que me mostraram como é bom ter uma grande família.

Aos mestres e amigos Pascoal e Lília, que me ensinaram de forma tão brilhante e me fizeram querer ser assim como eles.

Agradeço ao professor Dr. Luís Roberto Batista, por ter me orientado e me dado a oportunidade de crescer junto com a sua equipe.

Aos professores da Microbiologia, que me ensinaram como é grande o mundo dos pequenos!

Às amigas do laboratório de Micotoxinas e Micologia do DCA, Elizângela, Daiani, Cristiane, Mônica, Fabiana, Michele, Ábia, Michel, Josiane, Taís e Camila, por todo o carinho e pelos vários momentos de descontração. A dedicação e a ajuda de vocês tornam nossa equipe ainda mais forte.

Aos amigos de Lavras, Tiago, Carol, Luana, Paula, Maryeimy, Jesse, Cláudia, Alessandra, Karina, Mara e Mariana, pelos momentos de diversão e trabalho.

Agradeço aos meus queridos amigos Ludmila e Wesley, que fazem parte da minha família aqui em Lavras. Obrigada pela companhia e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia, Sara, Edinho e Mirian, pela ajuda.

À Universidade Federal de Lavras e aos Departamentos de Biologia, Ciência dos Alimentos e Fitopatologia, que me permitiram realizar este trabalho. À Capes, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao apoio da Cooperativa de Poço Fundo; do professor Leandro, do Instituto Federal de Minas Gerais - Campus Machado.

O mestrado era um sonho muito distante, mas, com muita persistência e dedicação, consegui realizá-lo! Obrigada a todos vocês que me permitiram um dia sonhar e continuar sonhando!

AGRADECIMENTO À FAPEMIG

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Fapemig, pelo apoio financeiro ao projeto Biodiversidade de fungos ocratoxigênicos em grãos de café de cultivo convencional e orgânico por taxonomia polifásica (Processo n°: APQ- 00781-08).

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral	1
2 Referencial Teórico	3
2.1 Biodiversidade de fungos filamentosos	3
2.2 Importância econômica e ambiental dos microrganismos.....	6
2.3 Fungos associados aos grãos de café	8
2.4 Fungos toxigênicos em grãos de café	10
2.5 Fungos toxigênicos em Sistema de Cultivo orgânico e Convencional.....	14
2.6 Produção de Café: Sistema Convencional e Orgânico	15
3 Referências bibliográficas	19
CAPÍTULO 2: Biodiversidade de Fungos Filamentosos em Grãos de Café sob Sistema de Cultivo Orgânico e Convencional	24
1 Resumo	25
2 Abstract	26
3 Introdução	27
4 Material e Métodos	29
4.1 Localização das áreas analisadas	29
4.2 Isolamento dos fungos filamentosos	29
4.3 Identificação dos isolados	30
4.3.1 Análise morfológica de <i>Aspergillus sp.</i> e <i>Penicillium sp.</i>	30
4.3.2 Caracterização e identificação de <i>Fusarium sp.</i>	31
4.3.3 Análise morfológica de <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Cladosporium</i> e <i>Trichoderma</i>	32
4.3.4 Identificação de <i>Colleotrichum</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Bipolaris</i> e <i>Epicoccum</i>	32
4.3.5 Identificação de <i>Phoma</i> e <i>Alternaria</i>	32
4.4 Análises estatísticas	32
4.5 Cálculo dos Índices de Biodiversidade	33

5 Resultados e Discussão	33
5.1 Contaminação geral das amostras de café	33
5.2 Microbiota dos grãos de café	34
5.3 Biodiversidade de fungos	41
5.4 Amostras de café do tipo Varrição e Pano	42
5.5 Associação de fungos com as espécies toxigênicas	45
5.5.1 Associação das espécies de fungos com <i>A. flavus</i> no café orgânico	44
6 Conclusões	47
7 Referências Bibliográficas	49
CAPÍTULO 3: Biodiversidade de Fungos em Grãos de Café Cultivados em Fazendas Orgânicas e Convencionais de Poço Fundo-MG	
1 Resumo	54
2 Abstract	55
3 Introdução	56
4 Material e Métodos	57
4.1 Material	58
4.2 Isolamento dos fungos filamentosos	58
4.3 Análise Morfológica dos fungos	60
4.3.1 Identificação de <i>Aspergillus sp.</i> e <i>Penicillium sp.</i>	60
4.3.2 Caracterização de <i>Fusarium sp.</i>	61
4.3.3 Identificação de <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Cladosporium</i> e <i>Trichoderma</i>	61
4.3.4 Caracterização de <i>Colleotrichum</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Bipolaris</i> e <i>Epicoccum</i>	61
4.4 Análise estatística	61
4.5 Cálculo dos índices de Biodiversidade	62
5 Resultados e Discussão	62
5.1 Isolamento da microbiota fúngica	62
5.2 Análise do processo de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%	64
5.3 Biodiversidade de fungos no café orgânico e convencional	68
6 Conclusões	71
7 Referências Bibliográficas	73
ANEXOS	78

RESUMO GERAL

COUTO, Fabiana Aparecida. **Biodiversidade de fungos filamentosos isolados de grãos de café de cultivo orgânico e convencional.** 2010. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A qualidade inferior do café pode ser justificada pela ocorrência de condições ambientais favoráveis à incidência de microrganismos contaminantes, ocorrência de pragas e doenças, seleção de cultivares e processamento pós-colheita. O estudo dos fungos filamentosos é importante para fornecer informações sobre fatores ambientais, qualidade microbiológica do solo, presença de microrganismos de importância biotecnológica e segurança dos produtos. Este estudo foi realizado com o objetivo de estudar a biodiversidade de fungos filamentosos presentes em grãos de café (*Coffea arabica* L.) orgânico e convencional, produzidos em fazendas do Sul de Minas Gerais. Nas amostras de café do sul de Minas, foram encontrados trezentos e quarenta e seis isolados, sendo encontradas 33 diferentes espécies pertencentes a 14 gêneros. A maior concentração de fungos filamentosos foi obtida nas amostras que não passaram pelo processo de desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a 1%. Após a desinfecção, o índice de contaminação reduziu-se drasticamente. Os principais gêneros encontrados nos grãos de café foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Duas espécies encontradas neste trabalho são de fundamental importância, devido ao seu potencial toxigênico: *A. ochraceus* e *A. flavus*. Estes fungos estão associados a várias espécies de fungos e algumas destas espécies são capazes de degradar as micotoxinas. Nas amostras de café do município de Poço Fundo, foram encontrados duzentos e doze isolados fúngicos, sendo encontradas vinte e três espécies pertencentes a onze gêneros. A biodiversidade encontrada nos grãos de café orgânico é maior do que a encontrada em grãos de café de sistema de cultivo convencional.

Palavras-chave: Biodiversidade, Fungos, Café

Orientador: Dr. Luís Roberto Batista - UFLA

GENERAL ABSTRACT

COUTO, Fabiana Aparecida. **Biodiversity filamentous fungi of isolated in coffee grains from organic and conventional crops.** 2010. 81p. Dissertation (Masters in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal of Lavras, Lavras.*

The inferior quality of the coffee can be justified for the occurrence of favorable environmental conditions to the incidence of contaminating microorganisms, control of curses and diseases, selection of you cultivate and processing after to crops. The study of the filamentous fungi is important to inform about environmental factors, quality microbiologic of the soil, presence of microorganisms of biotechnological importance and safety of the products. This study had as objective studies the biodiversity of present filamentous fungi in samples of organic and conventional coffee (*Coffea Arabica* L) produced in farms of the South of Minas Gerais. Three hundred and forty two isolated were obtained, being found thirty three different species belonging to fourteen genders. The largest concentration of filamentous fungi was obtained in the samples that didn't go by the disinfection process with hypochlorite of sodium to 1%. After the disinfection, the index of contamination reduced drastically. The main genders that were found in the coffee beans were *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Two species found in this healthy work of fundamental importance due to your potential toxigenics, *A.ochraceus* and *A.flavus*. These fungi are associated with several species of fungi and some of these are capable to degrade the mycotoxins. Samples of coffee in the city of Poço Fundo were obtained two hundred and twelve isolates fungus, and found twenty three species belonging to eleven genera. The biodiversity found in organic coffee beans is higher than that found in coffee beans from the conventional.

Key words: Biodiversity, Fungi, Coffee

Major Professor: Dr. Luís Roberto Batista – UFLA

CAPÍTULO 1

BIODIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é um produto agrícola extremamente importante para a economia brasileira e mundial. Embora a produção de café tenha se ampliado em várias regiões do mundo, o Brasil ainda continua sendo o líder nesse tipo de produção. Devido à crescente concorrência de mercado, aliada a uma maior procura por produtos de boa qualidade, o café tem sido intensamente pesquisado, visando obter maior valorização do seu preço.

Dentre os aspectos qualitativos do café, a incidência de microrganismos, como fungos, leveduras e bactérias, tem sido um dos principais fatores envolvidos. Os frutos estão expostos a uma diversidade de microrganismos que, quando encontram condições favoráveis para se desenvolver, infectam os grãos e ainda podem estar relacionados à má qualidade da bebida, por alterarem seu sabor e aroma. Além desses aspectos, os fungos podem produzir substâncias tóxicas denominadas micotoxinas que, mesmo em concentrações relativamente pequenas, causam uma série de doenças em humanos e animais.

Dentre as micotoxinas encontradas no café, a ocratoxina A (OTA) destaca-se por causar efeitos nefrotóxicos, hepatóxicos, imunossupresivos e carcinogênicos.

Além de ser produzido pelo sistema convencional, o café pode ser produzido pelo cultivo orgânico. O uso do sistema orgânico tem aumentado devido às exigências dos consumidores por produtos de melhor qualidade e a preocupações com o meio ambiente. Devido ao fato de não utilizar agrotóxicos e, conseqüentemente, não prejudicar o ecossistema, a opção por esse tipo de cultivo vem aumentando gradativamente.

Estudos conduzidos com café orgânico em diversos países demonstram que este tipo de cultivo mantém a biodiversidade de animais e microrganismos. No Brasil, têm-se realizado vários estudos sobre a presença de fungos filamentosos em grãos de café de cultivo convencional, principalmente aqueles relacionados à produção de micotoxinas. No entanto, existe uma deficiência em estudos sobre a diversidade de fungos em cafés produzidos de forma orgânica.

Esse tipo de pesquisa é fundamental porque, apesar de a extinção de espécies ser um processo natural, este tem sido intensificado devido a uma série de fatores antrópicos. Sendo assim, no Capítulo 1, descreve-se uma revisão sobre a importância da biodiversidade e da riqueza dos fungos filamentosos, o problema gerado pelo aquecimento ambiental e, com isso, o aumento na extinção de espécies. A importância econômica e ambiental dos fungos filamentosos também foi abordada, juntamente com os seus efeitos negativos como a produção de micotoxinas nos grãos de café, além da produção de café utilizando os dois sistemas de cultivo, orgânico e convencional. No Capítulo 2 apresentam-se os resultados dos fungos isolados nos grãos de café de cultivo orgânico e convencional, obtidos das amostras de Santo Antônio do Amparo, Poço Fundo e Campestre. Também foi realizada uma associação entre as espécies toxigênicas *A. ochraceus*, *A. flavus* e outros fungos encontrados nos grãos de café orgânico e convencional. No Capítulo 3, demonstram-se o isolamento e a identificação dos fungos filamentosos encontrados em amostras de café orgânico e convencional do município de Poço Fundo, MG, uma vez que os fatores ambientais estão diretamente envolvidos na biodiversidade microbiológica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biodiversidades de fungos filamentosos

A biodiversidade refere-se à interação de todas as espécies de microrganismos, plantas e animais existentes dentro um ecossistema (Altieri, 1999). Os sistemas agroecológicos que enfatizam a conservação do solo, da água e a recuperação da biodiversidade são necessários para satisfazer à crescente demanda socioeconômica e ambiental.

O número real de fungos é ainda desconhecido, no entanto, somente de 5% a 13% da estimativa global das espécies de fungos têm sido descrita (Wang et al., 2008). A estimativa da existência de 1,5 milhão de espécies de fungos é realizada com base na relação observada entre a diversidade de plantas e a diversidade de fungos em países onde se realizaram estudos suficientes para permitir uma estimativa razoável da verdadeira diversidade (Hawksworth, 1991).

De acordo com Moreira & Siqueira (2006), a biodiversidade microbiana ainda não é totalmente conhecida e, conseqüentemente, o seu potencial biotecnológico ainda não foi explorado. Há algumas razões para isso. Existem muitos microrganismos que não podem ser identificados morfológicamente e, até recentemente, eram identificados apenas por meio de crescimento em meios de cultura específicos e de testes bioquímicos.

Os fungos são conhecidos por serem extremamente diversificados e desempenharem diversas funções nos ecossistemas, como decomposição, mutualismo e patogenias. No entanto, na maioria dos casos, o papel individual dos fungos na natureza ainda é desconhecido.

Conforme Moreira et al. (2008), os fungos representam um dos grupos mais ricos em espécies de todos os organismos, com exceção dos insetos. Os

fungos existentes no solo são muito importantes na decomposição e na reciclagem de nutrientes vegetais. Por esta razão, os fungos interagem com uma grande comunidade microbiana, como bactérias, actinomicetos e pequenos invertebrados. Os fungos ascomicetos têm a capacidade de decompor a celulose e a hemicelulose. Esses microrganismos também são importantes em processos de degradação de xenobióticos e poluentes orgânicos que são jogados no solo.

Para Schmit & Mueller (2007), além de seu papel no ecossistema, os fungos têm grande importância econômica como agentes de controle biológico, como produtores de ácidos e enzimas, etc. No entanto, sem uma estimativa real da diversidade de fungos, é difícil determinar o nível de redundância de funções do ecossistema fornecida pelos fungos. O impacto positivo e negativo está relacionado ao conjunto total de espécies fúngicas. Portanto, é necessário utilizar alguns meios para estimar o total da riqueza de espécies de fungos.

O Brasil está entre os países que apresentam maior biodiversidade, sendo responsável pela conservação dessas espécies de microrganismos, dos ecossistemas naturais e dos processos biológicos (Lewinsohn & Prado, 2002). No entanto, sobre a diversidade microbiana brasileira existem poucos relatos científicos.

De acordo com Hole et al. (2005), a falta de conhecimento a respeito dos microrganismos é preocupante, pois a necessidade da expansão agrícola tem ameaçado a biodiversidade devido ao aumento populacional, à agricultura intensiva e à abundante aplicação de defensivos agrícolas. As previsões realizadas sobre o elevado número da população mundial relatam que, devido ao aumento da população humana, ocorrerá maior utilização das áreas agrícolas. Esta intensificação agrícola resultará em aumento na poluição da água e na erosão do solo e em problemas de segurança alimentar, conseqüentemente, levando ao declínio de microrganismos, vegetais e animais.

Cannon (1997) afirma que existe grande necessidade de elaborar técnicas que permitam avaliar de maneira rápida a biodiversidade. O interesse em estudar a biodiversidade em habitats naturais ameaçados é grande, pois, existem diversas ameaças, como a exploração insustentável, o desenvolvimento urbano e a poluição.

Hoje em dia, a biodiversidade de organismos está sendo ameaçada por diversos fatores ambientais e econômicos.

Em estudos realizados por Chapin et al. (2000), foi demonstrado que a queima de combustíveis fósseis e o desflorestamento têm aumentado em 30% a concentração de dióxido de carbono atmosférico. A concentração de gás metano e de outros gases que contribuem para o aquecimento do clima praticamente dobrou nos últimos três séculos. Os gases que contribuem para o efeito estufa são responsáveis por causar as mais rápidas mudanças climáticas que a Terra tem enfrentado desde o fim da última era glacial. Devido a todas essas alterações climáticas, a diversidade biológica também tem mudado e, por isso, muitas espécies foram eliminadas em áreas dominadas por influências humanas. Apesar da extinção ser um processo natural, ela tem aumentado drasticamente, devido às consequências das atividades humanas.

Segundo Tilman et al. (2001), durante os próximos 50 anos, a rápida expansão agrícola mundial, originada pela demanda por alimentos e o aumento de 50% da população mundial, irá causar uma drástica mudança ambiental. A população irá dobrar de tamanho e, conseqüentemente, irá dobrar a demanda por alimentos. A eutrofização, juntamente com a destruição do hábitat, causará prejuízos sem precedentes, como a perda do ecossistema e a extinção de espécies.

A taxa de perda da biodiversidade global continua a acelerar. A opinião dos pesquisadores é a de que, até o ano de 2050, haverá grande número de espécies extintas (Jenkins, 2003). O aumento da perda da biodiversidade é

resultado das combinações de alteração no uso da terra e alterações climáticas (Thomas et al., 2004).

Chapin et al. (2000) afirmam que as alterações na diversidade biológica podem reduzir as fontes de alimentos, combustíveis, recursos medicinais ou genéticos. Essas alterações também podem alterar a abundância de outras espécies que controlam processos do ecossistema, gerando novas alterações na composição da comunidade.

2.2 Importância econômica e ambiental dos microrganismos

Segundo Moreira et al. (2008), os microrganismos são responsáveis por uma série de processos, como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, controle biológico de doenças e pragas, purificação da água e decomposição de resíduos orgânicos e tóxicos. Estes processos são de fundamental importância para a sobrevivência de todos os seres deste planeta.

Os fungos filamentosos têm a capacidade de produzir uma série de enzimas de importância biotecnológica. As pectinases produzidas por fungos apresentam características importantes para a aplicação em bioprocessos (Malvessi & Silveira, 2004). As enzimas pectinolíticas são responsáveis pela degradação de uma molécula complexa de pectina presente em todos os tecidos vegetais jovens.

Dentre as espécies de fungos capazes de produzir enzimas pectinolíticas estão: *Alternaria mali*, *Aspergillus aculeatus*, *A. awamori*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. tubingensis*, *Colletotrichum lindemuthium*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Neurospora crassa* e *Rhizopus stolonifer* (Jayani et al., 2005).

De acordo Baker & Benneth (2008), os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* estão entre os microrganismos de maior importância econômica, pois eles podem ser utilizados em diversos processos na indústria de alimentos e

farmacêutica. Eles são valorizados principalmente pela produção de grande variedade de enzimas e de ácidos. A amilase e o ácido cítrico são os dois principais produtos industriais originados por estas espécies.

Os fungos do gênero *Aspergillus* podem ser divididos em Seções: *Flavi*, *Circundati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentii* (Klich, 2002).

As espécies da Seção *Circundati* são economicamente importantes, pois, algumas produzem a ocratoxina A. Esses microrganismos também são utilizados na biotransformação de esteroides e alcaloides (Varga et al., 2003).

Aspergillus da Seção *Flavi* possuem conídios em tons verde-amarelados e escleródios marrons (Klich, 2002). *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são as principais espécies produtoras de aflatoxinas desta Seção (Codner et al., 1963; Schroeder, 1966; Pitt & Hocking, 1997; Varga et al., 2003).

Segundo Perrone et al. (2007), os fungos que pertencem à Seção *Nigri* constituem um dos grupos mais difíceis de serem classificados e identificados. Eles são encontrados principalmente no solo e são responsáveis pela deterioração de alimentos e de outros materiais. Algumas cepas de *Aspergillus* desta Seção são muito importantes, pois são utilizadas em processos fermentativos para a produção de diversos ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas (Varga et al., 2003).

Os isolados de *Aspergillus niger* têm sido objeto de investigação biotecnológica por várias décadas. A importância deste fungo para a indústria alimentícia é conhecida desde 1919, quando ocorreu o primeiro relato de produção de ácido cítrico por *A. niger* (Abarca et al., 2004). O ácido cítrico é um ácido orgânico amplamente utilizado em produtos das indústrias de alimentos e bebidas, como refrigerantes, sucos de frutas, sobremesas, compotas, geleias, doces e vinhos (Varga et al., 2003;).

Conforme Schuster et al. (2002), mesmo tendo menor importância econômica, os ácidos glucônico e fumárico também são produzidos por *A. niger*. A partir de 1960, este fungo tornou-se uma poderosa fonte de produção de grande variedade de enzimas, como pectinases, proteases e amiloglucosidases, que são utilizadas em processos industriais, como panificação e processamentos de frutas.

De acordo Perrone et al. (2007), além dos impactos positivos das espécies de *Aspergillus*, estas também são responsáveis por diversas doenças em plantas e produtos vegetais. As espécies mais comuns são *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. alliaceus*. Estes microrganismos contaminam produtos agrícolas em diferentes fases, como pré-colheita, colheita, processamento e manuseio.

2.3 Fungos associados aos grãos de café

Segundo Bokhari (2007), assim como outros produtos agrícolas, os grãos de café estão sujeitos à contaminação por microrganismos durante o seu crescimento, após a colheita e durante o armazenamento. Esses microrganismos, principalmente bactérias, leveduras e fungos filamentosos, estão associados à má qualidade dessa bebida. A ação microbiana é prejudicial à qualidade do produto e a segurança deste dependerá das condições ambientais, assim como das culturas e do manejo.

Segundo estudos realizados por Perrone et al. (2007), diversos microrganismos têm sido isolados de produtos agrícolas, em diferentes etapas de processamento. A diversidade de fungos encontrados nos grãos de café depende de vários fatores como variedade do café, região geográfica, clima e método de processamento.

Lacey (1989) afirma que a contaminação dos microrganismos nas partes aéreas das plantas inicia-se assim que as folhas e as flores são expostas ao ar. Os

primeiros organismos que colonizam são as bactérias, seguidas pelas leveduras e fungos saprófitas e patogênicos. Os fungos continuam a se desenvolver em todas as partes das plantas, acelerando o seu desenvolvimento com a senescência da planta e em frutos maduros. Durante o processo de colheita, ocorre uma desordem no ecossistema dos grãos, marcada pelas alterações extremas do ambiente da lavoura para uma condição relativamente estável do armazenamento. Estes eventos são acompanhados por profundas mudanças na população microbiana.

A contaminação dos grãos pelos fungos filamentosos é, provavelmente, maior em regiões úmidas do que em regiões secas e, talvez, seja maior em cereais que nascem expostos ao ar do que naqueles que crescem protegidos por vagem (Christensen & Kaufmann, 1969).

Krug (1940) realizou um dos primeiros estudos sobre os fungos envolvidos na qualidade do café. Este autor comprovou que uma ou mais espécies de fungos foram as responsáveis pelo mau gosto do café, principalmente daqueles que foram provenientes do processo de varrição. Os dois fatores mais importantes para o desenvolvimento dos microrganismos foram o calor e a umidade.

Falhas durante as operações agrícolas favorecem as contaminações microbianas e pode prejudicar a qualidade do café. Uma queda nas exportações entre 1961 e 1995 ocorreu devido à demanda por cafés especiais de bebida superior pelos países importadores, Estados Unidos, Alemanha, Itália, Japão e França (Carvalho et al., 1997). No entanto, o Brasil ainda é o maior produtor de café, tendo produzido, em 2009, um total de 39,47 milhões de sacas de 60 quilos do produto. Essa grande produção de café influencia o mercado de trabalho como fonte geradora de empregos e mão-de-obra no meio rural (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2009).

Um dos primeiros trabalhos sobre a ocorrência de microrganismos associados aos frutos de café de diferentes locais do estado de Minas Gerais foi realizado por Chalfoun & Carvalho (1989). Nesta pesquisa, foi possível observar que os frutos cereja estavam contaminados principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A contaminação destes fungos era superficial; no entanto, a intensificação do ataque destes fungos ocorreu na fase de secagem. Portanto, o beneficiamento do café não foi eficaz na eliminação nem na redução da contaminação por estes gêneros de fungos.

Estudo sobre a diversidade microbiana de frutos de café em diferentes estágios de beneficiamento processados pelo método natural foi realizado, tendo sido identificadas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* e *Pestalotia* (Silva et al., 2008).

2.4 Fungos toxigênicos em grãos de café

Os microrganismos contaminam os frutos e os grãos de café durante todas as fases de desenvolvimento, colheita, preparo, transporte e armazenamento (Batista et al., 2003).

Os fungos que estão associados aos frutos e grãos de café podem, sob condições específicas, causar perdas de qualidade, produzindo odores e sabores desagradáveis (Krug, 1940). Além deste prejuízo econômico, eles também são responsáveis por produzir metabólitos tóxicos denominados micotoxinas, que comprometem a segurança do produto final.

Os *Aspergillus* pertencentes à seção *Flavi* incluem espécies que apresentam conídios com coloração verde-amarela para verde-oliva (Klich, 2002). Algumas espécies da Seção *Flavi* são capazes de sintetizar as aflatoxinas, que são metabólitos secundários economicamente importantes produzidos por espécies de *Aspergillus*. As aflatoxinas foram inicialmente isoladas das espécies de *A. flavus* e, mais tarde, foram relatadas em outras espécies. Após estudos,

alguns autores relataram que nem todas as linhagens de *A. flavus* produzem aflatoxinas e que esta espécie produz apenas as toxinas do tipo B1 e B2.

Além da aflatoxina, isolados do gênero *Aspergillus* também produzem outra micotoxina, denominada ocratoxina. Um dos primeiros isolados produtores de OA foi o fungo *A. ochraceus* e, até hoje, estudos demonstram que esta é uma das principais espécies ocratoxigênicas isoladas de frutos e grãos de café (Taniwaki et al., 2003; Batista et al., 2009).

De acordo com Bennet & Klich (2003), o crescimento de fungos filamentosos em alimentos pode resultar na produção de micotoxinas. Os microrganismos que frequentemente são encontrados em amostras de café são os fungos micotoxigênicos. As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos que, mesmo ingeridas em pequenas concentrações por animais e seres humanos, causam alterações biológicas prejudiciais à saúde. As micotoxinas mais comuns são aflatoxinas, zearalenonas, tricotecenos, fumonisinas e ocratoxinas. Embora tenham sido identificadas, aproximadamente, trezentas micotoxinas diferentes, apenas doze tipos apresentam importância relevante para a saúde humana.

Nas amostras de café, a presença das espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Circundati* e Seção *Nigri* são as principais responsáveis pela produção de ocratoxina A (Urbano et al., 2001; Batista et al., 2003). As espécies da Seção *Circundati*, além de produzirem esta micotoxina, também são responsáveis pela produção de ácido penicílico, xantomegnina e viomeleína (Frisvad & Samson, 2000).

Além dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, os do gênero *Penicillium* também são capazes de produzir micotoxinas. As únicas espécies consideradas produtoras de ocratoxina A são o *P. verrucosum*, comum em cereais e produtos agrícolas de climas temperados e o *P. nordicum*, mais comum em produtos derivados de carne e queijos (Samson et al., 2000).

Urbano et al. (2001) analisaram a ocorrência de Ocratoxina A e fungos ocratoxigênicos em frutos de café em diferentes estádios de maturação. Estes autores observaram que todas as amostras apresentaram contaminação com fungo dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* e *Aspergillus*. Foram identificadas 88,1% (de 42 isolados testados) de espécies de *A. ochraceus* e apenas 11,5% (de 87 isolados testados) de *A. niger* produtores de ocratoxina A.

Batista et al. (2003) analisaram 45 amostras de 10 municípios da região sul do estado de Minas Gerais para identificar os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* que estavam associados a grãos de café beneficiados. Os autores utilizaram dois tipos de plaqueamento, com e sem o processo de desinfecção com hipoclorito a 1%. Das amostras analisadas antes da desinfecção, 95,55% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus*, com maior ocorrência de fungos pertencentes à Seção *Nigri*, presentes em 88,37% das amostras contaminadas. Os fungos pertencentes à Seção *Circundati* contaminaram 65,12% das amostras, os da Seção *Flavi*, 44,19% e da Seção *Versicolores*, 6,98%. Os fungos do gênero *Penicillium* contaminaram 42,22% das amostras sem o processo de desinfecção. No entanto, após o processo de desinfecção, 46,66% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* e 24,44% com fungos do gênero *Penicillium*. Mesmo após o processo de desinfecção houve um predomínio das espécies da Seção *Nigri*, seguida pelas espécies da Seção *Circundati*, com 16,27% das amostras e pela seção *Flavi*, com 6,98%. As principais espécies do gênero *Aspergillus* identificadas foram *A. auricomus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. flavus*, *A. tamaritii*, *A. niger* var *niger*, *A. niger* var *awamori*, *A. foetidus*, *A. versicolor* e *A. sydowii*. Do gênero *Penicillium*, foram identificadas 8 espécies: *Penicillium aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. glabrum* e *P. solitum*. A maior

parte dos isolados identificados fazia parte da contaminação externa do grão, que pode se desenvolver a partir do momento em que as condições ambientais estejam favoráveis.

Silva (2004) analisou a sucessão ecológica e a interação microbiana em frutos e grãos de café e relatou que as principais espécies encontradas foram: *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamarii*, *A. sydowii*, *A. foetidus*, *Aspergillus dimorphicus*, *P. brevicompactum*, *Penicillium roqueforti*, *P. citrinum*, *P. solitum*, além de outras espécies pertencentes a outros gêneros, como *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani* e *Fusarium lateritium*.

Suarez-Quiroz et al. (2004) avaliaram diferentes tipos de processamento de café (processo úmido e seco), em diferentes fases da colheita ao armazenamento e identificaram os fungos produtores de OTA. Os autores utilizaram o plaqueamento direto e encontraram as seguintes espécies de fungos filamentosos: *Penicillium citrinum*, *Mucor hiemalis*, *P. glabrum*, *P. minioluteum*, *P. citrinum*, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium* sp., *Aspergillus fumigatus*, *A. candidum*, *A. tamarii*, *Botrytis* sp., *P. italicum*, *Eurotium* sp., *Fusarium* sp., *Eurotium chevalieri*, *Cladosporium cladosporoides* e *Penicillium minioluteum*.

Batista & Chalfoun (2007) analisaram a presença de fungos toxigênicos em grãos de café secos em terreiro de terra, cimento, asfalto e identificaram como produtoras de ocratoxina A as espécies *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus*. Os maiores índices de contaminação com a esta micotoxina foram nos cafés do tipo varrição, boia e mistura seca em terreiro de terra. Estes dados indicam que o terreiro de terra aumenta o risco de contaminação com ocratoxina A em grãos de café.

Bokhari (2007) analisou 48 amostras de café coletadas em mercados locais na Arábia Saudita. Foram identificadas 62 espécies de fungos filamentosos. *Aspergillus* foi o gênero mais comum, sendo encontrado em 100%

das amostras analisadas, representando 16,7% da contagem total de fungos. *A. flavus* e *A. niger* foram as espécies mais comuns, encontradas com alta frequência. As outras espécies que foram relatadas em menor ocorrência foram: *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. sydowii*, *A. tamaritii* e *A. terreus*. Além das espécies de *Aspergillus* também foram encontrados outros gêneros, como *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium moniliforme*, *Emericella nidulans*, *Eurotium amstelodami*, *M. hiemalis* e *Neurospora* sp.

Para analisar a contaminação de fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café verde do Vietnã, Leong et al.(2007) utilizaram o processo de desinfecção de superfície e relataram que 89% dos grãos foram contaminados por *Aspergillus niger*, enquanto 14% foram infectados por *A. carbonarius* e *Aspergillus*, da Seção *Circundati*. No entanto, nenhum dos isolados de *A. niger* e *A. ochraceus* foram produtores de OA, mas foram detectadas em isolados de *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae* e *A. steynii*. Além dos fungos produtores de OA, estes autores encontraram isolados de *A. flavus*, *A. tamaritii*, *Rhizopus* spp., *A. fumigatus* e *P. citrinum*. Estes fungos tipicamente coinfetam grãos juntamente com *Aspergillus*, da Seção *Nigri*.

2.5 Fungos toxigênicos em sistema de cultivo orgânico e convencional em diferentes culturas

Segundo Hole et al. (2005), a maioria dos estudos realizados sobre o cultivo orgânico e convencional indicou que existe grande diferença entre estes dois sistemas de cultivo. Existem também inconsistências nesses estudos, devido à complexidade das interações e do grande número de variáveis ambientais. No entanto, essas inconsistências indicam que os benefícios para a biodiversidade da agricultura biológica podem variar de acordo com os fatores, como localização, clima, cultura, tipo e espécie.

Bengtsson et al. (2005) realizaram uma meta-análise sobre a biodiversidade em fazendas orgânicas e convencionais, utilizando 42 estudos, comparando estes dois sistemas de cultivo. Os resultados demonstraram que a riqueza de espécies foi aproximadamente 30% maior nas fazendas orgânicas do que nas fazendas convencionais. As aves, insetos, organismos do solo e as plantas responderam positivamente à agricultura orgânica.

Recentemente, tem-se sugerido que os alimentos orgânicos seriam mais propensos à contaminação por micotoxinas do que os alimentos convencionais, pois não são tratados da mesma forma com agentes antifúngicos (Khouba, 2003). No entanto, ainda não existem evidências que indiquem que os alimentos especiais sejam mais propensos à contaminação por micotoxinas do que os convencionais (FAO, 2000).

No ano de 2003, na Lituânia, amostras de trigo e cevada foram obtidas de onze fazendas orgânicas e treze convencionais, para análise da presença de fungos toxigênicos nesses dois sistemas de cultivo. Por meio do método Elisa, as micotoxinas deoxynivalenol, toxina T-2, zearalenona, aflatoxinas e ocratoxinas foram analisadas. Os resultados comprovaram que o trigo, em fazendas orgânicas, estava contaminado com 70,5% a mais que na fazenda convencional. No entanto, os resultados com a amostra de cevada mostraram que a contaminação com fungos filamentosos era 24,8% menor quando comparado com o sistema convencional. Nos dois sistemas de cultivo, a contaminação dos grãos foi devido à presença dos fungos do gênero *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Nas fazendas orgânicas, fungos de outros gêneros também foram encontrados, como *Bipolaris*, *Botrytis* e *Septoria*. Os resultados toxigênicos mostraram que os principais fungos produtores de toxina eram do gênero *Fusarium* e *Alternaria* e as toxinas mais encontradas nos grãos foram deoxynivalenol e zearalenona. Estas foram mais frequentes nos

grãos dos dois sistemas de cultivo, no entanto, as aflatoxinas e a ocratoxina foram encontradas em pequenas quantidades (Bakutis et al., 2006).

2.6 Produção de café: sistema convencional e orgânico

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea arabica* L.). A produção de café em 2009 foi de 28,9 milhões de sacas. O estado de Minas Gerais é o maior produtor, com 19,60 milhões de sacas ou 68,08% do total do café produzido no Brasil (CONAB, 2009).

Nos últimos anos ocorreu um aumento na concorrência do mercado, levando a uma melhoria na qualidade do produto, pois o café destaca-se como um dos produtos agrícolas que têm seus preços baseados em parâmetros qualitativos. Dentre os aspectos qualitativos do café, a incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita tem sido um dos principais fatores envolvidos. Os frutos estão expostos a uma diversidade de microrganismos que, encontrando condições favoráveis para se desenvolver, infectam os grãos.

Segundo Pasin et al. (2002), algumas espécies de microrganismos, tais como bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos, estão relacionadas à má qualidade da bebida, por alterarem seu sabor e aroma ou por produzirem metabólitos tóxicos prejudiciais à saúde. O café *Coffea arabica* L. representa uma das maiores fontes de receita para o Brasil, contudo, os países importadores requerem cafés de qualidade superior. Por esta razão, a exportação brasileira tem sofrido quedas significativas e a demanda por produtos de melhor qualidade mostra a importância de associar produção e qualidade.

Conforme Theodoro et al. (2002), existe uma crescente demanda por novas tecnologias de produção e beneficiamento do café, devido às exigências do mercado internacional por cafés de boa qualidade. Entre 1961 e 1995, ocorreu uma queda nas exportações deste produto devido à demanda por cafés

especiais de bebida superior pelos países importadores, como Estados Unidos, Alemanha, Itália, Japão e França. No entanto, mesmo após a queda nas exportações, o Brasil ainda é o maior produtor mundial de café.

Além da presença dos microrganismos, alguns compostos voláteis, ácidos graxos e enzimas que estão presentes nos grãos de café estão diretamente relacionados com a qualidade da bebida. Alguns estudos demonstram que a presença desses compostos pode ser influenciada pela adubação do cafeeiro (Theodoro et al., 2002).

O café pode ser produzido utilizando-se dois tipos de sistema: convencional e orgânico.

A produção agrícola convencional é dependente de uso programado de herbicidas, pesticidas e aplicações de nutrientes inorgânicos e, por isso, esse método é considerado ambientalmente menos saudável do que os métodos orgânicos (Bettiol et al., 2002). A contaminação da água e do solo devido ao freqüente uso de pesticidas e fertilizantes é um dos principais problemas causados pela agricultura intensiva (Bengtsson et al., 2005).

Ao contrário do sistema convencional, o sistema orgânico tem a finalidade de produzir alimentos sem o uso de pesticidas, herbicidas e fertilizantes químicos (Khouba, 2003).

Segundo Theodoro (2003), o café orgânico é produzido sem a utilização de agrotóxicos e adubos de alta solubilidade que podem ser substituídos por subprodutos da reciclagem da matéria orgânica. Os principais subprodutos utilizados são dejetos de animais, biofertilizantes, polpa e casca de café, compostos e húmus de minhoca. Para que a produção de café seja considerada orgânica, a lavoura deve estar isenta do uso de defensivos e adubos químicos por pelo menos três anos (Bakutis et al., 2006).

A principal diferença entre o sistema de cultivo orgânico e o convencional está no fato de que os produtores de café orgânico restringem o

uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, enquanto os produtores de café convencional utilizam intensamente esses insumos (Theodoro, 2003).

De acordo com Theodoro et al. (2002), o café orgânico vem ganhando destaque entre os consumidores que cada vez mais se preocupam com a saúde e com a qualidade do produto. A produção de café em sistemas orgânicos procura atender às diversas exigências dos consumidores que se preocupam com sua qualidade de vida e com as questões ambientais oriundas deste sistema de cultivo.

Bettiol et al. (2002) afirmam que, no mercado mundial, existe crescente demanda por produtos orgânicos. No ano de 2006, o mercado de produtos orgânicos cresceu quase 14%, o que representa cerca de 37 bilhões de dólares. Por meio de previsões de mercado, acredita-se que, até 2012, esse valor possa chegar a 74 bilhões de dólares, ou seja, um aumento de 50%. Mesmo com o crescimento da demanda pela agricultura orgânica, ainda não existem informações suficientes de pesquisas sobre este assunto.

Segundo Theodoro (2003), o preço obtido na comercialização do café orgânico é maior que na do café convencional. No entanto, a produção por meio do sistema orgânico requer maior quantidade de mão-de-obra, fertilizantes orgânicos e sua produtividade pode ser menor que a da produção feita de maneira tradicional.

Novos estudos sobre o sistema orgânico podem levar ao crescimento desse tipo de produção, bem como à implementação de práticas que conduzem à melhora da saúde humana e que produza o rendimento sustentável (Letourneau & Bothwell, 2008).

A biodiversidade que é conservada em fazendas orgânicas promove benefícios biológicos que compensam as práticas nas fazendas convencionais, como a aplicação de pesticidas (Letourneau & Bothwell, 2008).

Bengtsson et al. (2005) investigaram trabalhos que comparavam sistemas orgânicos e convencionais publicados até dezembro de 2002. Foram encontrados 66 artigos abordando este tema e, após concluírem o estudo, aqueles autores demonstraram que, geralmente, a agricultura orgânica aumenta a riqueza de espécies, principalmente de plantas, pássaros e insetos predadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antonie van Leuwnhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 33-49, Aug. 2004.
- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 19-21, June 1999.
- BAKER, S. E.; BENNETH, J. W. An overview of the genus *aspergillus*. In: GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. **The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008. 551p.
- BAKUTIS, B.; BALIUKONIENE, V.; LUGAUSKAS, A. Factors predetermining the abundance of fungi and mycotoxins in grain from organic and conventional farms. **Ekologija**, Taskent, n. 3, p. 122-127, 2006.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, Maio/jun. 2007.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; SILVA, C. F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; SCHWAN, R. F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.
- BENGTSSON, J.; AHNSTROM, J.; WEIBULL, A. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a metaanalysis. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 261-69, Apr. 2005.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July, 2003.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J. A. H.; LIGO, M. A. V.; MINEIRO, J. L. de C. Soil organisms in organic and conventional cropping systems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 565-572, jul. /set. 2002.

BOKHARI, F. M. Mycotoxins and toxigenic fungi arabic coffee beans in Saudi Arabic. **Advances in Biological Research**, Varanasi , v. 1, n. 1/2, p. 56-66, Jan./Apr. 2007.

CANNON, P. F. Estrategies for rapid assessment of fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 6, n. 5, p. 669-680, May 1997.

CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Microflora associada a frutos e grãos de café de diferentes locais, tipos de colheita e diferentes etapas de preparo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEIRA 15, 1987, Maringá. **Resumo...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1989. p. 17-21.

CHAPIN, F. S.; ZAVALETA, E. S.; EVINER, E. T.; NAYLOR, R. L.; HOOPER, T.U. Consequence of changing biodiversity. **Nature**, Washington, v. 405, p. 234-242, May 2000.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. **Grain storage: the role of fungi in quality loss**. Minneapolis: University of Minnes, 1969. 153 p.

CODNER, R. C.; SARGEANT, K.; YEO, R. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 5, n. 3, p. 185-192, Feb. 1963.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2008/2009**. Brasília: Conab, 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos.08.09.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Organic Food and Farming. **Myth and reality: organic vs non-organic, the facts**. Bristol House: The Soil Association, 2000. 32p.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. Nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* sub. *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Stanford, v. 45, p. 201-207, 2000.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.

HOLE, D. G.; PERKINS, A. J.; WILSON, J. D. Does organic farming benefit biodiversity? **Biological Conservation**, Essex, v. 122, n. 1, p. 113-130, Mar. 2005.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sept. 2005.

JENKINS, M. Prospects for biodiversity. **Science**, Washington, v. 302, n. 5648, p. 1175-1177, Nov. 2003.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauctures, 2002. 116 p.

KOUBA, M. Quality of organic animal products. **Livestock Production Science**, Washington, v. 80, n. 3, p. 33-40, Mar. 2003.

KRUG, H. P. Cafés duros: (III) relação entre porcentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto de Café**, São Paulo, v. 26, n. 169, p. 1827-1831, Mar. 1940.

LACEY, J. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, n. 18, p. 11-25, Sept. 1989.

LEONG, S. L.; HIEN, L. T.; ANT, V.; TRANG, N. T.; HOOKING, A. D.; SCOTT, E. S. Ochratoxin A: producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

LETOURNEAU, D. K.; BOTHWELL, S. G. Comparison of organic and conventional farms: challenging ecologists to make biodiversity functional. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, v. 6, n. 8, p. 430-438, Aug. 2008.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira**: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 2002. 176p.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, set. 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. v. 1.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S.; CHALFOUN, S. M.; PÁDUA, T. R. P. Efeito de micronutrientes a população fúngica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 918-926, nov./dez. 2002.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRlich, J.; VARGA, J. C.; FRISVAD, M.; MEIJER, A.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 53-66, 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, n. 16, n. 1, p. 99-111, Jan. 2007.

SCHROEDER, H. W. Effect of corn steep liquor on micelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 14, n. 3, p. 381-385, May 1966.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 59, n. 4/5, p. 426-435, Aug. 2002.

SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiocratoxina A associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arábica* L.) do município de Lavras-MG.** 2004. 156 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCWUAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous during fermentation drying and storage of coffee (*Coffea Arabica* L) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 238-240, jul./set. 2008.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZALEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SOLARR-GALIWDO, S.; GUIRAUD, J. P. Study of ochratoxin: producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 501-507, Apr. 2004.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

THEODORO, C. G. C.; GUIMARÃES, J. B. C. Avaliação do estado nutricional de agroecossistemas de café orgânico no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p.1222- 1230, nov./dez. 2003.

THEODORO, V. C. de A.; GUIMARÃES, R. J.; MOURÃO JÚNIOR, M.; CHAGAS, S. J. de R. Alterações da qualidade de grãos de cafés (*C. arabica* L.) colhidos no pano e no chão, provenientes de sistemas de manejo orgânico, em conversão e convencional. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 27, pt. 4, p. 38-44, jul. 2002. Especial Café.

THOMAS, C. D.; CAMERON, A.; GREEN, R. E.; BAKKENES, M.; BEAUMONT, L. J.; COLLINGHAM, Y. C.; ERASMUS, B. F. N.; DE SIQUEIRA, M. F.; GRAINGER, A.; HANNAH, L.; HUGHES, L.; HUNTLEY, B.; VAN JAARSVELD, A. S.; MIDGLEY, G. F.; MILES, L.; ORTEGA HUERTA, M. A.; PETERSON, A. T.; PHILLIPS, O. L.; WILLIAMS, S. E. Extinction risk from climate change. **Nature**, Washington, v. 427, n. 2121, p. 145-148, Jan. 2004.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTÔNIO, C.; DOBSON, A; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, Washington, v. 292, n. 5515, p. 281-284, Apr. 2001.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. E.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 30-32, Mar. 2003.

WANG, H.; HYDE, K.; SOYTONG, K. Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand. **Journal of Zhejiang University: science B**, Hangzhou, v. 9, n. 10, p. 835-841, Oct. 2008.

CAPÍTULO 2

BIODIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM GRÃOS DE CAFÉ SOB SISTEMA DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL

1 RESUMO

O Brasil está entre os países que apresentam as maiores biodiversidades do mundo. No entanto, não existem informações suficientes para explorar de forma sustentável essa riqueza microbiológica. A expansão da agricultura é uma das maiores ameaças à biodiversidade, provocando a extinção de espécies. O sistema orgânico de produção tem sido visto como uma poderosa solução para diminuir a iminência destas extinções. Este estudo foi realizado com o objetivo de isolar e identificar as espécies de fungos isoladas dos grãos de café cultivados em sistema orgânico e convencional. Das 18 amostras de café orgânico e convencional. Foram identificados trezentos e quarenta e seis isolados fúngicos, sendo 33 diferentes espécies pertencentes a 14 gêneros. As amostras antes do processo de desinfecção tiveram maior índice de biodiversidade. As amostras de café orgânico apresentaram um maior índice de riqueza e de biodiversidade de fungos filamentosos. Duas espécies encontradas neste estudo são de extrema importância, pois são toxigênicas, *A. flavus* e *A. ochraceus*. A associação dos fungos toxigênicos com outras espécies é importante, pois alguns microrganismos são capazes de degradar as micotoxinas. Nos grãos de café orgânico, *A. flavus* associou-se com *C. cladosporioides*, *A. ochraceus* e *P. brevicompactum*. O fungo *A. ochraceus*, no café convencional, associou-se apenas com *C. cladosporioides*. Estes resultados demonstram que existe uma grande diversidade de fungos e que estes podem ser utilizados em processos biotecnológicos e como indicadores ambientais.

Palavras-chave: Biodiversidade, Fungos, Micotoxinas

2 ABSTRACT

Brazil is a country with the great biodiversity, however, there aren't enough information to explore in a maintainable way this microbiological wealth. The expansion agriculture is among the largest current threats to the biodiversity provoking the extinction of species. This study had as objective isolates and to identify the isolated species of fungi in the coffee beans cultivated in organic and conventional system. Three hundred and forty two isolated fungi were obtained, being thirty three different species belonging to fourteen genders. The samples that were not disinfected had a larger index of contamination. Samples of organic coffee had a higher rate of wealth and diversity of filamentous fungi. Two species found in this healthy work of extreme importance, because they are toxigenics (*A. flavus* e *A. ochraceus*). The study of the association of the species of fungi with the toxicogenics species is necessary because some species have the capacity to degrade the mycotoxins. In the organic coffee *A. flavus* was associated with *C. cladosporioides*, *A. ochraceus* and *P. brevicompactum*. The fungi *A. ochraceus* in the conventional coffee only associated with *C. cladosporioides*. These results demonstrate that a great diversity of fungi exists and that these can be used in biotechnological processes and as environmental indicators.

Key words: Biodiversity, Fungi, Mycotoxin

3 INTRODUÇÃO

A biodiversidade refere-se à interação de todas as espécies de microrganismos, plantas e animais dentro de um ecossistema (Altiere et al., 1999). Estima-se que apenas 5% das espécies de fungos filamentosos tenham sido descritas (Hawksworth, 1991). Portanto, a biodiversidade microbiana ainda não é totalmente conhecida e, conseqüentemente, o seu potencial biotecnológico ainda não foi completamente explorado (Moreira & Siqueira, 2006).

Os fungos representam um dos grupos mais ricos em espécies de todos os organismos e estes apresentam grande importância econômica como agentes de controle biológico, como produtores de ácidos e enzimas (Schmit & Mueller, 2007, Moreira et al., 2008).

O Brasil está entre os países que apresentam as maiores biodiversidades do mundo (Moreira et al., 2008). No entanto, sobre a diversidade microbiana brasileira existem poucos relatos científicos. Essa falta de conhecimento a respeito dos microrganismos é preocupante, pois a necessidade da expansão agrícola tem ameaçado a biodiversidade (Hole et al., 2005).

De acordo com Fischer (2007), o emprego de pesticidas de amplo espectro não só controla as pragas ou os agentes causadores de doenças, mas também os inimigos naturais. Esta classe de pesticidas pode levar ao empobrecimento do ecossistema, causando redução da biodiversidade e ao que pode levar a um aumento de patógenos.

A perda da biodiversidade biológica pode reduzir as fontes de alimentos, combustíveis, recursos medicinais ou genéticos e alterar a abundância de outras espécies que controlam processos do ecossistema (Chapin et al., 2000).

Diversos microrganismos têm sido isolados de produtos agrícolas em diferentes etapas de processamento. A diversidade de fungos encontrados nos grãos de café do Brasil tem sido relatada em vários estudos (Batista et al., 2003;

Silva et al., 2000; Silva et al., 2004; Silva et al., 2008, Batista & Chalfoun, 2007; Batista et al., 2009).

O Brasil é um dos líderes na produção mundial de café. No entanto, esta prática está se tornando cada vez mais arriscada, devido à grande flutuação no preço do café no mercado internacional, em consequência do crescimento da produção mundial e de novos competidores no mercado. Por essa razão, os produtores de café tentam produzir cafés especiais, ditos orgânicos, que, apesar do alto custo de produção, podem ser comercializados por um melhor preço.

A principal diferença entre o café produzido de forma tradicional e o café produzido organicamente está no fato de que os produtores de café orgânico restringem o uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos (Theodoro, 2003). Portanto, além de contaminar excessivamente o ambiente, a cultura convencional pode diminuir a biodiversidade encontrada no ecossistema. Durante as últimas décadas, a população mundial tem se sensibilizado na conservação do meio ambiente e com a segurança alimentar. Por esta razão, tem aumentado o consumo de produtos orgânicos.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a cultura orgânica mantém a biodiversidade, promovendo benefícios biológicos que compensam as práticas convencionais (Letourneau & Bothwell, 2008). O presente trabalho foi realizado com o objetivo avaliar a biodiversidade encontrada em amostras de cafés produzidos em fazendas convencionais e orgânicas da região sul de Minas Gerais e estabelecer uma possível associação entre as espécies toxigênicas e não toxigênicas desses diferentes tipos de cultivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização das áreas analisadas

A biodiversidade de fungos filamentosos em grãos de café beneficiado ocorreu em três localidades do Sul de Minas, tendo sido coletadas amostras nos municípios de Poço Fundo, Santo Antônio do Amparo e Campestre.

Na tabela 1, é possível observar o número de amostras de grãos de café de cultivo orgânico e convencional.

TABELA 1 Localização e número de amostras de grãos de café de cultivo orgânico e convencional.

Município	Sistema de Cultivo	Tipo de café	Número de amostras
Santo Antônio do Amparo	Orgânico	Varrição	1
Santo Antônio do Amparo	Orgânico	Pano	1
Poço Fundo	Orgânico	Varrição	3
Poço Fundo	Orgânico	Pano	5
Poço Fundo	Convencional	Varrição	3
Poço Fundo	Convencional	Pano	4
Campestre	Convencional	Varrição	1

Essas amostras foram transferidas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) e do Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, onde se realizou a identificação dos fungos até espécie.

4.2 Isolamento dos fungos filamentosos

Para o isolamento dos fungos associados aos grãos de café beneficiado, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto, conforme Sansom et al. (2004).

De cada amostra foram plaqueados 200 grãos ao acaso, sendo 100 com desinfecção superficial e 100 sem desinfecção superficial. Foi realizada uma desinfestação com hipoclorito de sódio a 1%, visando à identificação dos fungos presentes no interior dos grãos.

Durante o processo de desinfestação, inicialmente, foi feita uma imersão das amostras em álcool 70%, para uma primeira desinfecção superficial e diminuir a tensão superficial do grão, permitindo o melhor contato entre a solução de hipoclorito e os grãos. Depois, as amostras foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 segundos, sendo utilizada uma solução de hipoclorito para cada amostra analisada. E, como último passo da desinfecção, as amostras de café foram lavadas com água destilada e esterilizada, com a finalidade de retirar resíduos de hipoclorito de sódio.

Após a desinfestação, os 100 grãos foram transferidos assepticamente para as placas de Petri, contendo meio de cultura dicloram rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (glicose 10g; peptona bacteriológica 5g; KH_2PO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; ágar 15g; água destilada 1L; rosa de bengala 25mg, dicloran 2mg; cloranfenicol 100g). Em cada placa foram colocados 25 grãos de cada amostra, os quais foram incubados, a 25°C, por 7 dias. A contaminação dos grãos foi expressa em porcentagem de grãos contaminados, conforme Sansom et al. (2004).

O isolamento dos fungos foi realizado com o auxílio de palitos de madeira esterilizados em autoclave (20 minutos a 121°C), transferindo-os com um leve toque na cabeça conidial dos fungos, que cresceram na superfície do grão, para uma placa de Petri contendo malt extract ágar (MA- extrato de malte

20g, ágar 20g e água destilada 1L), os quais foram repicados sucessivamente até a obtenção de culturas puras.

4.3 Identificação de fungos filamentosos

4.3.1 Identificação dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Após o isolamento feito em MA, as colônias dos fungos apresentam características morfológicas que possibilitam fazer um direcionamento dos meios de cultura que devem ser utilizados de acordo com o provável gênero. Os isolados do gênero *Aspergillus* foram incubados em czapek yeast agar (CYA) (K₂HPO₄ 1,0g; concentrado de czapek 10,0 mL; extrato de levedura 5,0g; ágar 15,0g; água destilada 1 L; concentrado czapek NaNO₃ 30g; KCl 5,0g; MgSO₄.7H₂O 5,0g; FeSO₄.7H₂O 0,1g; ZnSO₄.7H₂O 0,1g; CuSO₄.5 H₂O 0,05g, água destilada 100ml) e MEA (extrato de malte 20,0g; peptona 1,0g; Glucose 30,0g; ágar 20g; água destilada 1 L), a 25°C e 37°C e, após 7 dias de incubação, foram observadas as características microscópicas e macroscópicas descritas por Klich (2002).

As características macroscópicas observadas fornecem coloração e diâmetro das colônias, presença ou ausência e coloração dos escleródios e coloração no reverso, em todos os meios de cultura. E as características microscópicas: arranjo entre métulas e fiálides ligadas à vesícula, comprimento do conidióforo, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiálides, textura dos conídios e do conidióforo.

Os isolados de *Aspergillus* foram identificados conforme Klich (2002) e as espécies de *Penicillium* de acordo com Pitt (2000), sendo essas identificações amparadas por Pitt & Hocking (1997) e Samson et al. (2000).

4.3.2 Identificação de espécies do gênero *Fusarium* sp.

Após o processo de purificação, a identificação dos isolados seguiu o protocolo de Nelson et al. (1983). O cultivo dos isolados foi em placas contendo meio de SNA (KH₂PO₄ 1g; KNO₃ 1g; MgSO₄. 7H₂O; KCl 0,5g; glicose 0,2g; sacarose 0,2g; ágar 20g e água destilada 1L) e MA, para analisar as características microscópicas e em BDA, para observar a coloração das colônias. As placas foram mantidas em BOD, com fotoperíodo a 21°C, por 10 dias.

4.3.3 Análise das espécies dos gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium* e *Trichoderma*

Após a confirmação destes gêneros, eles foram cultivados em extrato de malte (MEA), a 25°C, por sete dias e a identificação dos isolados foi realizada conforme Samson et al. (2000).

4.3.4 Identificação de espécies dos gêneros *Colleototrichum*, *Glomerella*, *Bipolaris* e *Epicoccum*

Os isolados que pertencem a estes gêneros foram inoculados em malt extract ágar (MA), a 25°C, por 7 dias e a identificação destes fungos foi realizada de acordo com Ellis (1971).

4.3.5 Identificação de espécies do gênero *Phoma* e *Alternaria*

Os isolados de *Phoma* e *Alternaria* foram cultivados em Aveia ágar (aveia 30g, água destilada 1L, ágar 15g), por sete dias, à temperatura de 25°C e identificados conforme Ellis (1971).

4.4 Análises estatísticas

A metodologia estatística utilizada neste trabalho consistiu na construção de um intervalo de confiança de 95% para o desvio padrão, com a

finalidade de inferir a dispersão da ocorrência de fungos filamentosos nas amostras de café orgânico e convencional. Posteriormente, com o propósito de identificar as relações entre as espécies toxigênicas e não toxigênicas, por meio da formação de agrupamentos, utilizou-se a técnica de correspondência simples, conforme a metodologia descrita por Guedes et al. (1999).

4.5 Cálculos dos índices de biodiversidade

Para avaliar a diversidade das colônias fúngicas dos grãos de café de cultivo orgânico e convencional, foram utilizados os seguintes índices:

1) Índice de riqueza de Margalef (R_m): estima o número de espécies levando-se em conta o número total de indivíduos é dado por:

$$R_m = (S - 1) / (\ln n)$$

em que S é o número de espécies e n é o número de indivíduos identificados.

2) Índice de diversidade de Shannon-Weiner (H'): leva em conta a riqueza e o número de indivíduos de cada espécie, sendo comumente utilizado em estudos de ecologia de comunidades (Magurran, 1988).

$$H' = - \sum (p_i \cdot \ln p_i)$$

em que p_i é a proporção de indivíduos de cada espécie i em relação ao número total de indivíduos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contaminação geral das amostras de café

Todas as amostras estudadas apresentaram contaminações por diversas espécies de fungos filamentosos. Um alto nível de infecção por fungos foi observado nas amostras que não passaram pelo processo de desinfecção com hipoclorito a 1%. No entanto, quando se realizou a desinfecção da superfície dos grãos, o índice de contaminação por fungos filamentosos reduziu drasticamente. Este resultado já era esperado, pois a desinfecção retira a maioria dos fungos encontrados no exterior do grão, favorecendo apenas a prevalência dos fungos do interior.

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram detectados em todas as amostras que não utilizaram o processo de desinfecção. Os isolados da Seção *Circundati* apresentaram 49,35% de contaminação, seguidos de 47,26% da Seção *Nigri* e 3,37% da Seção *Flavi*. Das espécies da Seção *Circundati*, *A. ochraceus* foi a mais comum, apresentando 73,17% e tem sido identificada em outros estudos com frutos e grãos de café (Batista & Chaulfoun, 2007; Batista et al., 2003; Nasser, 2001; Pasin & Abrey, 2000; Pereira, 2002; Silva, 2000; Silva et al., 2004; Suarez-Quiroz et al., 2004). As outras espécies também têm sido identificadas nas amostras de café, como *A. sulphureus*, que representou 17,7% (Batista et al., 2003; Nasser, 2001) e *A. ostianus*, 9,75%.

5.2 Microbiota dos grãos de café

Das 18 amostras analisadas, sendo 10 de café orgânico e 8 de café convencional, foram obtidos 346 isolados, tendo sido encontradas 32 diferentes espécies, pertencentes a 14 gêneros. Na Tabela 2, podem-se observar as principais espécies de fungos filamentosos encontradas nos grãos de café

beneficiados de *Coffea arabica* L, produzidos por meio dos sistemas de cultivo orgânico e convencional.

As amostras de café *Coffea arabica* L, provenientes de 3 municípios do Sul de Minas Gerais, apresentaram grande potencial microbiológico, tendo em vista a diversidade de espécies encontradas, pertencentes a diferentes gêneros, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Bipolaris*, *Glomerella*, *Colleotrichum*, *Alternaria* e *Gliocladium*. Vários gêneros de fungos também já foram relatados em pesquisas sobre os frutos do cafeeiro, desde o campo até o armazenamento, entre eles espécies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Wallemia* e outros (Bucheli et al., 1998; Carvalho et al., 1997; Chalfoun & Batista, 2003; Joosten et al., 2001; Prado et al., 2004; Leong et al., 2007).

A ocorrência dos principais fungos foi ilustrada em uma análise descritiva sintetizada na Figura 1, para cada tratamento avaliado.

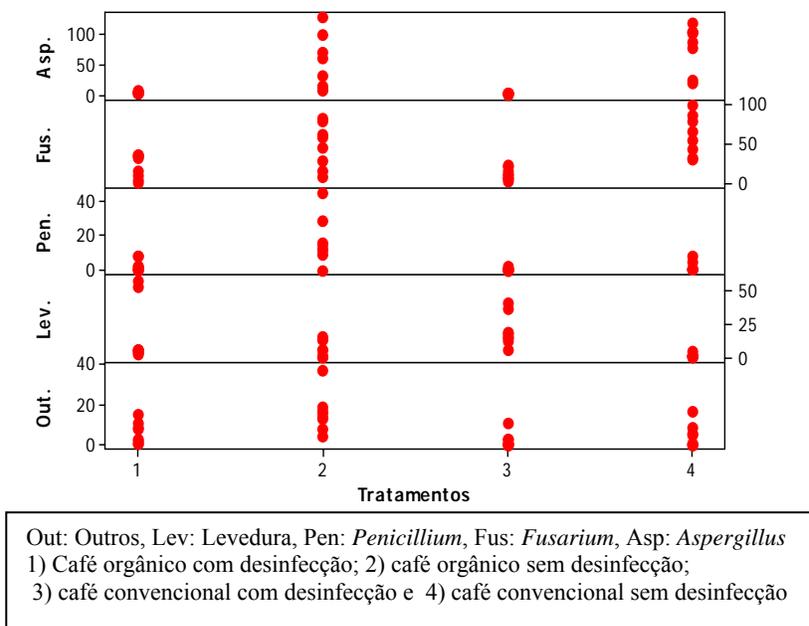


FIGURA 1 Frequência de fungos filamentosos nos grãos de café beneficiados cultivados sob o sistema orgânico e convencional, com e sem o processo de desinfecção.

Estes resultados indicam que a frequência dos principais gêneros foram *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo estes os principais responsáveis pela produção de micotoxinas (Cast, 2003). Resultados semelhantes também foram obtidos por Batista et al. (2003), Batista & Chaulfoun (2007), Silva et al. (2008) e Visotto et al. (2008).

De acordo com Batista et al. (2001), a presença desses gêneros no café alerta para uma possível presença de micotoxinas, como aflatoxina B1 e B2, ocratoxina A, B e C, ácidos ciclopiazônico e esterigmatocistina.

As amostras que obtiveram a maior infecção por fungos filamentosos foram os agrupamentos 2 (café orgânico sem desinfecção) e 4 (café convencional sem desinfecção), que correspondem às amostras que não sofreram a desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%. Tal fato é perceptível na Figura 1

pela maior frequência de fungos, sendo esta, superior em relação aos demais tratamentos. Desse modo, na contaminação, estão sendo considerados tanto os fungos que se localizam no exterior do grão quanto os fungos internos.

Os tratamentos 1 e 3, quando comparados aos outros tratamentos, resultaram em uma redução expressiva de contaminação, uma vez que, a realização na desinfecção dos grãos, os fungos do exterior foram eliminados. Noonim et al. (2008), analisando amostras de café com e sem o processo de desinfecção da superfície, relataram que, após a utilização do método, a contaminação dos grãos reduziu de 98% para 60%.

Nas amostras de café orgânico em que não foi utilizado o processo de desinfestação, os isolados de *Aspergillus* apresentaram 97,71% de contaminação. Contudo, após o tratamento com hipoclorito de sódio a 1%, a contaminação reduziu para 2,28%. Isso indica que as espécies do gênero *Aspergillus* contaminam principalmente o exterior do grão de café. De acordo com Klich (2002), os isolados de *Aspergillus* apresentam ampla distribuição, sendo encontrados frequentemente em regiões quentes. A distribuição desses fungos está relacionada com o clima, a vegetação e o solo.

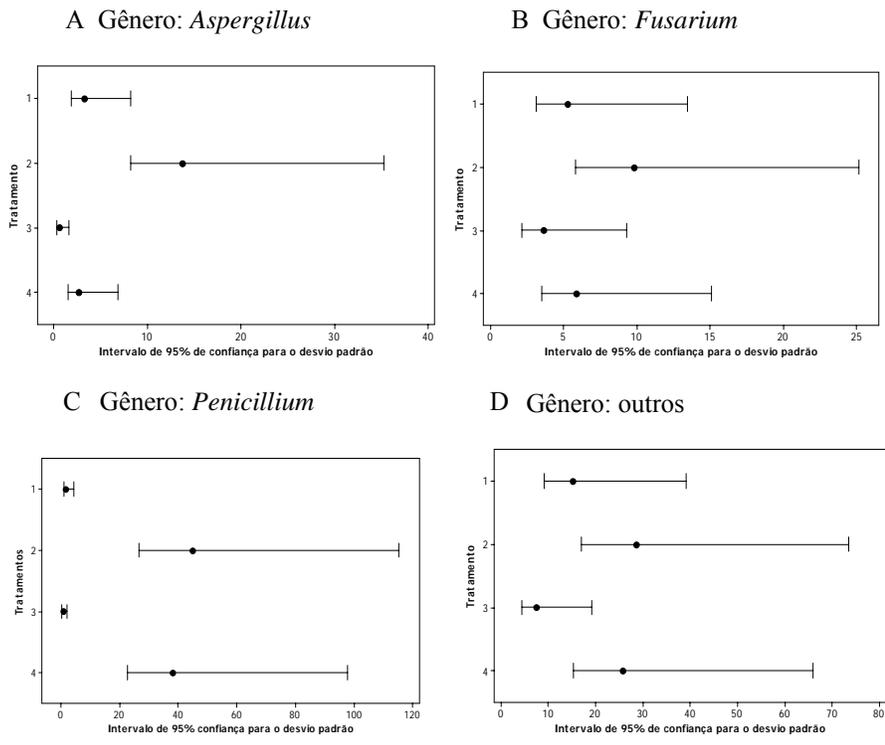


FIGURA 2 Análise da dispersão de fungos filamentosos nos dois sistemas de cultivo de grãos de café (Tratamento 1: café orgânico com desinfecção, 2: café orgânico sem desinfecção, 3: café convencional com desinfecção e 4: café convencional sem desinfecção).

Convém salientar que a concentração dos fungos, ilustrados na Figura 1 considerando as frequências percentuais, não contempla a variabilidade existente nas amostras, o que torna viável investigar a homogeneidade das amostras consideradas em decorrência a este problema. Os gráficos ilustrados na Figura 2 correspondem a resultados específicos a dispersão das respostas obtidas em cada amostra para os tratamentos avaliados em função dos fungos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e outros. Neste contexto, procede-se com a seguinte discussão:

Uma alta dispersão de fungos do gênero *Aspergillus* foi encontrada nas amostras de café orgânico com e sem o processo de desinfestação (Figura 2 A).

Em relação aos fungos do gênero *Aspergillus* (Figura 2 A), as amostras submetidas aos tratamentos 1 e 2, revelaram uma maior variabilidade. Supostamente, uma das amostras que resultaram em resposta discrepante em relação à média pode ser explicada pela ocorrência de fungos.

Os fungos pertencentes às Seções *Circundati*, *Nigri* e *Flavi* foram encontrados em frutos de café em um estudo realizado por Pitt (2000). A presença desses fungos no café não é desejável, pois muitas espécies deste gênero são produtoras de micotoxinas. Diversas espécies, como *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae*, foram relatadas como sendo produtoras de ocratoxina A em café. Segundo Petzinger & Weidenbach (2002), a bebida do café, contribui significativamente para a ingestão de ocratoxina A.

Uma alta dispersão de fungos do gênero *Fusarium* também foi encontrada nas amostras de café orgânico com e sem o processo de desinfestação (Figura 2 B). Em relação aos fungos do gênero *Fusarium*, as amostras que foram submetidas aos tratamentos 1 e 2, revelaram uma maior variabilidade. No entanto, umas das amostras resultaram em resposta discrepante em relação à média e também pode ser explicada pela ocorrência de fungos.

Ainda na Figura 2 (B), é possível verificar que os fungos do gênero *Fusarium* infectaram principalmente as amostras de café que não sofreram o processo de desinfecção. Chalfoun & Carvalho (1998) relataram a predominância dos isolados de *Fusarium* em amostras de café. Esses fungos ainda não tinham infectado os frutos sadios, portanto, a contaminação era apenas superficial.

Para os fungos do gênero *Penicillium* (Figura 2 C), também foi encontrada uma alta dispersão nas amostras de café dos dois sistemas de cultivo. As amostras que foram submetidas aos tratamentos 2 e 4, revelaram uma maior variabilidade. O processo de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1% reduziu

drasticamente o índice de contaminação desses fungos. As espécies de *P. verrucosum* e *P. nordicum* são capazes de produzir a ocratoxina A. A capacidade de *P. verrucosum* em produzir esta micotoxina foi relatada em vários trabalhos (Frisvad 1981; Frisvad & Filtenborg, 1989; Lund & Frisvad, 1994).

Os resultados da identificação dos fungos nas amostras de café orgânico e convencional do tipo pano e varrição podem ser analisados na Tabela 2.

TABELA 2 Identificação de fungos filamentosos isolados em grãos de café de cultivo orgânico e convencional.

Espécies	CONVENCIONAL				ORGÂNICO			
	PANO		VARRIÇÃO		PANO		VARRIÇÃO	
	Com desin.	Sem desin.	Com desin.	Sem desin.	Com desin.	Sem desin.	Com desin.	Sem desin.
<i>Alternaria</i>								
<i>A. alternata</i>	6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i>								
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	7	6	4	2
<i>A. foetidus</i>	5	3	1	-	3	9	1	-
<i>A. niger</i>	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i> Agregados	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	3	14	4	9
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>A. ostianus</i>	4	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	2	-
<i>A. sulphureus</i>	-	-	-	-	5	-	2	-
<i>A. tamarii</i>	-	-	-	-	-	3	-	-
<i>A. tubingensis</i>	-	13	-	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	-	3	-	-
<i>Bipolaris</i> sp.	-	-	-	-	4	4	7	-
<i>Cladosporium</i>								
<i>C. cladosporioides</i>	4	-	-	3	8	7	5	7
<i>Colleotrichum</i>								
<i>C. gloesporioides</i>	-	-	-	-	3	4	2	-
<i>Epicoccum</i>								
<i>E. purpurascens</i>	6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i>								
<i>F. equiseti</i>	2	-	-	-	6	4	2	-
<i>F. oxysporum</i>	1	-	-	6	4	-	4	2
<i>F. semitectum</i>	-	-	-	8	-	5	-	8
<i>F. solani</i>	-	-	-	-	-	6	5	9
<i>Gliocladium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Glomerella</i>								
<i>G. cingulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Mucor</i>								
<i>M. hiemalis</i>	-	-	-	-	4	-	-	7

... Continua ...

TABELA 2, Cont.

<i>Penicillium</i>								
<i>P. brevicompactum</i>	8	3	-	-	6	14	1	-
<i>P. citrinum</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. hirsutum</i>	-	-	-	-	-	-	3	-
<i>P. solitum</i>	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	-	-	6	6	-	-
<i>Rhizopus</i>								
<i>R. stolonifer</i>	8	1	-	-	-	-	-	-
<i>T. harzianum</i>	-	-	-	-	1	-	4	4

Com desin.: Com desinfecção e Sem desin.: sem desinfecção

5.3 Biodiversidade de fungos

Das 32 espécies encontradas nos grãos de café orgânico e convencional, 12 foram exclusivas do café orgânico, sendo: *Fusarium solani*, *Colleototrichum gloesporioides*, *Aspergillus tamarisii*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. versicolor*, *Penicillium hirsutum*, *Trichoderma harzianum*, *Phoma* spp., *Bipolaris* spp., *Glomerella cingulata* e *Mucor hiemalis*. Foi observado o maior índice de riqueza nas amostras de café orgânico ($R_m = 4,18$) do que nas amostras de café convencional ($R_m = 3,24$). Isso demonstra que, no sistema orgânico, a riqueza de espécies é maior do que no cultivo convencional.

Quanto à diversidade de espécies, o resultado do índice de Shannon para o café de cultivo orgânico foi de ($H' = 5,18$), enquanto que para o cultivo convencional foi de ($H' = 4,60$). Portanto, de acordo com o índice de Margalef e de Shannon, a riqueza e a diversidade de espécies de fungos filamentosos são maiores no sistema orgânico.

O uso intensivo de produtos agrícolas nos sistemas convencionais pode afetar a biodiversidade do solo de forma negativa conforme Altieri, 1999.

Estes resultados são próximos dos obtidos por Hole et al. (2005) e Bengtsson et al. (2005) que, após realizarem um meta-análise, concluíram que a riqueza de espécies foi aproximadamente 30% maior nas fazendas orgânicas do que nas convencionais. Entretanto, a biodiversidade pode variar de acordo com diferentes fatores, como localização, clima, cultura, tipo e espécie (Hole et al., 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que as fazendas orgânicas apresentam uma maior riqueza de espécies do que nas fazendas convencionais (Bengtsson, 2005; Mader et al., 2002; Stokstad, 2002, Delate et al., 2004).

Segundo Altieri (1994), há muitas evidências de que a preservação da biodiversidade dentro do agroecossistema tem papel fundamental na reciclagem de nutrientes, no controle do microclima, na regulação de processos hidrológicos, na detoxificação de compostos nocivos e no controle biológico de pragas.

Apesar de terem sido encontrados 14 gêneros (Tabela 2), *Aspergillus* e *Penicillium* foram os que apresentaram o maior número de espécies tanto no café orgânico quanto no café convencional. Doze espécies de *Aspergillus* foram divididas em quatro grupos: Seção *Nigri*, *Circundati*, *Flavi* e *Versicolor*, de acordo com Klich (2002), e cinco espécies de *Penicillium*: *P. brevicompactum*, *P. hirsutum*, *P. crustosum*, *P. citrinum*, *P. solitum*.

5.4 Amostras de café do tipo pano e varrição

Analisando os cafés do tipo pano e varrição, é possível verificar que a maioria das espécies identificadas neste estudo foi isolada do café do tipo pano. No entanto, a parcela varrição é reconhecida como sendo a mais comprometida em termos de quantidade de microrganismos considerados indesejáveis para a qualidade do café (Batista et al., 2007).

A maior incidência de *C. cladosporioides* ocorreu nas amostras do tipo pano. Esta espécie coloniza principalmente as partes externas dos grãos

(Martins et al., 2001) e ainda funciona como uma barreira à entrada de outros fungos prejudiciais à qualidade do café.

Na Figura 3 (A, B, C e D) está ilustrada a diversidade de fungos obtida das amostras de café orgânico e convencional.

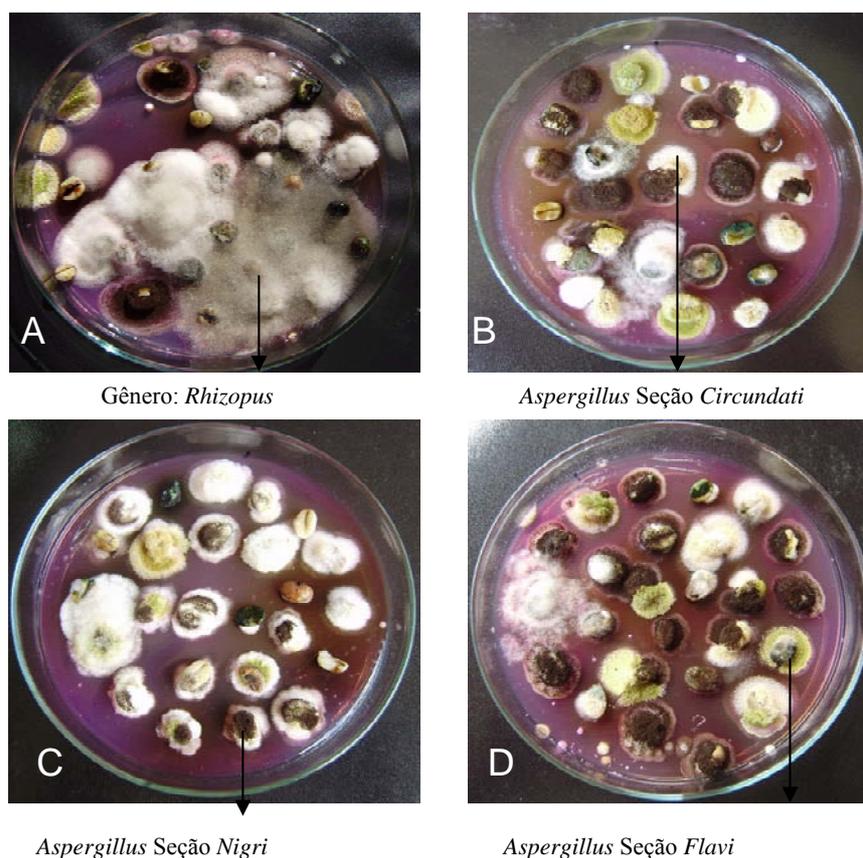


FIGURA 3 (A, B, C e D) Microbiota associada a grãos beneficiados de café (*Coffea arabica* L.) por meio de plaqueamento direto.

5.5 Associação de fungos com as espécies toxigênicas

As análises demonstram os fungos filamentosos que estão associados com as espécies de fungos toxigênicos e indicam a similaridade ou a dissimilaridade entre estas espécies. E, nas Figuras 4, 5, 6 e 7, observa-se quais espécies de fungos estão associadas com as espécies toxigênicas.

Para estas análises, foram selecionadas as amostras que apresentaram contaminações com *A. ochraceus* que é uma dos principais

produtores de ocratoxina A no café e *A. flavus* conhecido como sendo produtor de aflatoxina, para cada sistema de cultivo.

O estudo da associação de fungos com as espécies toxigênicas, observadas nas amostras foi realizado utilizando a técnica de análise de correspondência conforme Guedes et al. (1999). Os resultados são ilustrados nas Figuras 4 (A,B,C e D).

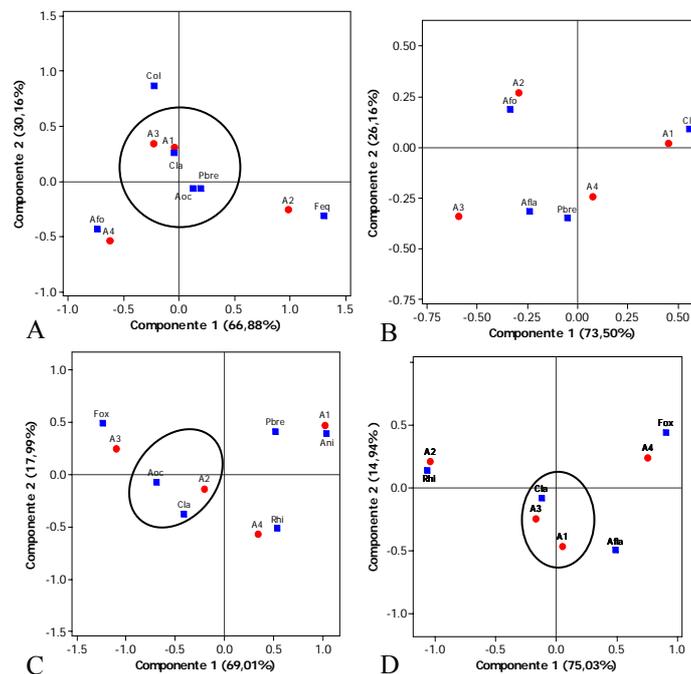


FIGURA 4 Gráfico do perfil da associação de fungos toxigênicos nos grãos de café de cultivo orgânico e convencional. A: *A. flavus* no café orgânico x fungos, B: *A. ochraceus* no café orgânico x fungos, C: *A. flavus* no café convencional x fungos e D: *A. ochraceus* no café convencional x fungos.

De acordo com os resultados ilustrados na Figura 4 (A), foi possível verificar a associação entre as amostras 1 e 3 com os outros fungos. As

espécies que estão associadas com *A. flavus* no café orgânico são *Cladosporium cladosporioides*, *A. ochraceus* e *P. brevicompactum*.

No entanto, de acordo com as coordenadas e as contribuições, não é possível associar *Colleotrichum gloesporioides*, *Fusarium equiseti* e *A. foetidus* com esse fungo toxigênico.

Os resultados ilustrados na Figura 4(B) demonstram, por meio das coordenadas e das contribuições, que não existe uma associação evidente entre as amostras 1, 2, 3 e 4 e os outros fungos com as espécies *A. foetidus*, *A. flavus*, *P. brevicompactum* e *Cladosporium*. Tal afirmação é feita de acordo com os valores encontrados na tabela 3 e 4(em anexo), mais especificamente das coordenadas e contribuições analisadas simultaneamente para cada componente.

Os resultados encontrados na Figura 4(C) evidenciam a formação de um grupo por meio da associação entre *A. flavus*, *A. ochraceus* e *C. cladosporioides* no café convencional. Um estudo realizado por Shantha (1999) revelou que o fungo *Cladosporium* sp. foi a espécie menos eficiente para degradar a aflatoxina, registrando menos de 10% de inibição.

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 4(D), é possível verificar que, por meio das coordenadas e contribuições, houve a formação de apenas um grupo. O fungo *C. cladosporioides* associou-se com *A. ochraceus* nas amostras 1 e 3. Conforme Pereira (2008), *C. cladosporioides* tem a capacidade de degradar mais de 85% da ocratoxina produzida pelo *A. ochraceus*. No entanto, os fungos *R. stolonifer*, *F. oxysporum* e *A. flavus* não estão associados com esse fungo toxigênico. Em estudo realizado por Abrunhosa et al. (2002) foi demonstrado que este fungo tem capacidade significativa de degradar a ocratoxina A.

Os resultados da associação de espécies de fungos com as espécies toxigênicas indicam que tanto no café convencional e no orgânico, *A. ochraceus* e *A. flavus* estão associado com *Cladosporium cladosporioides*. Esse fungo pode ser um bioprotetor para o café orgânico e convencional, frente a *A. ochraceus*. De acordo com Martins et al. (2001), o crescimento de

Cladosporium funciona como uma barreira à entrada de outros fungos prejudiciais à qualidade do café. Portanto, a interação entre *A. ochraceus* e *Cladosporium cladosporioides* pode ser considerada positiva para a segurança do café.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

. *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foram os principais gêneros de fungos encontrados nos grãos de café orgânico e convencional;

. foram identificados 346 isolados de fungos, sendo 32 espécies e 14 diferentes gêneros associados às amostras de café, nos dois sistemas de cultivo;

. as espécies de fungos filamentosos encontradas no café orgânico foram: *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sulphureus*, *A. tamarii*, *A. versicolor*, *Bipolaris* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Colleototrichum gloesporioides*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. semitectum*, *Gliocladium* sp., *G. cingulata*, *M. hiemalis*, *P. brevicompactum*, *P. hirsutum*, *Phoma* sp. e *T. harzianum*; e no café convencional foram encontradas as seguintes espécies: *Alternaria alternata*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. niger* Agregados, *A. ostianus*, *A. tubingensis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. solitum* e *R. histolonifer*;

. a riqueza e a biodiversidade de fungos filamentosos foram maiores nas amostras de café orgânico do que no convencional;

. existe associação entre o fungo *A. ochraceus* e *Cladosporium cladosporioides* no café convencional;

. existe uma associação entre o fungo *A. flavus* e *Cladosporium cladosporioides* no café orgânico e convencional.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, Dec. 2002.
- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 19-21, June 1999.
- ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. L. **Biodiversity and pest management in agroecosystems**. 2. ed. New York: Food Products, 1994. 185p.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 26, pt. 3, p. 11-16, nov. 2003. Especial Café.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; SILVA, C. F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; SCHWAN, R. F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.
- BENGTSSON, J.; AHNSTROM, J.; WEIBULL, A. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a metaanalysis. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 261-269, Apr. 2005.
- BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 11, p. 4507-4511, Nov. 1998.
- CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos de café *Aspergillus* & *Penicillium***. Brasília: Embrapa, 2003. 69 p.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade: colheita e preparo do café**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 55p.

CHAPIN, F. S.; ZAVALETA, E. S.; EVINER, E. T.; NAYLOR, R. L.; HOOPER, T.U. Consequence of changing biodiversity. **Nature**, Washington, v. 405, p. 234-242, May 2000.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, 2003. (Task Force Report, 139).

DELATE, K.; CAMBARDELLA, C. A. Agroecosystem performance during transition to certified organic grain production. **Agronomy Journal**, Madison, v. 96, n. 5, p. 1288-1289, Sept. 2004.

ELLIS, M. B. ***Dematiaceous hyphomycetes***. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.

FRISVAD, J. C. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric *Penicillia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 568-579, Oct. 1981.

FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Terverticillate *penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. **Mycologia**, New York, v. 81, n. 6, p. 837-861, Nov./Dec. 1989.

GUEDES, T. A.; IVANQUI, I. L.; MARTINS, A. B. T.; COCHIA, E. B. R. Seleção de variáveis categóricas utilizando análise de correspondência e análise de procrustes. **Acta Scientiarum: technology**, Maringá, v. 21, n. 1, p. 861- 868, jan./dez. 1999.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.

HOLE, D. G.; PERKINS, A. J.; WILSON, J. D. Does organic farming benefit biodiversity? **Biological Conservation**, Essex, v. 122, n. 1, p. 113-130, Mar. 2005.

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 39-44, Apr. 2001.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

LEONG, S. L.; HIEN, L. T.; N, T. V.; TRANG, N. T.; HOOKING, A. D.; SCOTT, E.S. Ochratoxin A: producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

LETOURNEAU, D. K.; BOTHWELL, S. G. Comparison of organic and conventional farms: challenging ecologists to make biodiversity functional. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, v. 6, n. 8, p. 430-438, Aug. 2008.

LUND, F. S.; FRISVAD, J. C. Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 5, p. 481-492, May 1994.

MÄDER, P.; FLIEBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, London, v. 296, n. 5573, p. 1694-1697, May 2002.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurements**. Sydney: Croom Helm, 1988. 179p.

MARTINS, A. N.; SILVEIRA, A. P.; SILVA, R. J. N. Avaliação da microbiota presente no café armazenado e recém beneficiado. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: CBP&D-Café/Embrapa Café, 2001. p. 59.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. v. 1.

NASSER, P. P. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A**. 2001. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species an illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1983. 193p.
- NOONIM, P.; AHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology od Food Microbiology**, London, v. 128, n. 2, p. 197-202, Dec. 2008.
- PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos crus e ocorrência de ocratoxina A em diferentes cultivares de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000, Poços de Caldas. **Anais... Poços de Caldas: Embrapa Café**, 2000. p. 1028-1031.
- PEREIRA, L. J. A. **Estratégias para o controle de Ocratoxina A em alimentos**. 2008. p. 236. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Braga.
- PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 245-250, Sept. 2002.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, Dec. 2000. Supplement.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.
- PRADO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, Feb. 2004.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.
- SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 1, p. 45-61, Jan. 2004.

SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n. 1, p. 99-111, Jan. 2007.

SHANTHA, T. Fungal degradation of aflatoxin B1. **Natural Toxins**, New York, v. 7, n. 5, p.175-178, June 1999.

SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiocratoxina A associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras-MG**. 2004. 156 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCWUAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous during fermentation drying and storage of coffee (*Coffea Arabica* L) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 238-240, jul./set. 2008.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* L in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept., 2000.

STOKSTAD, E. Organic farms many benefits. **Science**, Washington, v. 296, n. 5573, p. 1589, May 2002.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZALEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SOLARR-GALIWDO, S.; GUIRAUD, J. P. Study of ochratoxin: producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 501-507, Apr. 2004.

THEODORO, C. G. C.; GUIMARÃES, J. B. C. Avaliação do estado nutricional de agroecossistemas de café orgânico no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1222-1230, nov./dez. 2003.

VISOTTO, L. E.; COSTA, M. D.; COELHO, J. L. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; MENDES, F. Q. Isolamento de fungos toxigênicos em grãos de café (*Coffea arabica* L.) e avaliação da produção *in vitro* de ocratoxina A. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 32, pt. 10, p. 11-16, jul. 2008. Especial Café.

CAPÍTULO 3

BIODIVERSIDADE DE FUNGOS EM GRÃOS DE CAFÉ CULTIVADOS EM FAZENDAS ORGÂNICAS E CONVENCIONAIS DE POÇO FUNDO, MG

1 RESUMO

Os frutos de café produzidos de forma orgânica ou convencional estão sujeitos à contaminação de diversas espécies de fungos que podem estar relacionados à má qualidade da bebida e à produção de micotoxinas. Este estudo foi realizado com o objetivo de identificar a biodiversidade de fungos filamentosos isolados nos grãos de café produzidos em fazendas orgânicas e convencionais de uma mesma localidade. Das 15 amostras analisadas, foram identificados 212 isolados, pertencentes a 11 diferentes gêneros. O principal gênero encontrado foi o *Aspergillus*, sendo isolados fungos das Seções *Circundati*, *Nigri*, *Flavi* e *Versicolores*. As amostras que obtiveram o maior índice de contaminação foram as que não passaram pelo processo de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%. As amostras de grãos de café de cultivo orgânico apresentaram o maior índice de riqueza e diversidade dentro de uma mesma localidade, com condições climáticas muito próximas. Uma maior diversidade de fungos neste sistema é fundamental para manter o equilíbrio ecológico, a sustentabilidade e fornecer ferramentas para combater doenças e pragas.

Palavras-chave: café, fungos, desinfecção

2 ABSTRACT

The fruits of organic and conventional coffee are subject the contamination of several species of fungi and they can be related to the bad quality of the drink and the mycotoxins production. This study had as objective identifies the biodiversity of isolated filamentous fungi in the coffee beans produced in organic and conventional farms of a same place. Two hundred and twelve isolated belonging to eleven different genders were identified of the fifteen analyzed samples. The main found gender was *Aspergillus*, being isolated fungi of the Sections *Circundati*, *Nigri*, *Flavi* and *Versicolores*. The samples that obtained the largest index of contamination were the ones that didn't pass for the disinfection process with hypochlorite of sodium to 1%. The samples of coffee beans of organic cultivation presented the largest wealth index and diversity inside of a same place with very close climatic conditions. A larger diversity of fungi in this system is fundamental to maintain the ecological balance and to supply tools to combat diseases and curses.

Key words: Coffee, Fungi, Disinfections

3 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea arabica* L.). A produção de café em 2009 foi de 28,9 milhões de sacas. O estado de Minas Gerais é o maior produtor, com 19,60 milhões de sacas ou 68,08% do total do café produzido no Brasil (CONAB, 2009).

Os frutos estão expostos a uma diversidade de microrganismos que podem estar relacionados à má qualidade da bebida e à produção de micotoxinas. A falta de boas práticas agrícolas aumenta as contaminações e o desenvolvimento de microrganismos, principalmente os fungos toxigênicos. Esses fungos contaminam os frutos e os grãos de café durante todas as fases de desenvolvimento, que são colheita, preparo, transporte e armazenamento (Batista et al., 2003; Batista et al., 2009).

Nas últimas décadas, tem aumentado a procura por alimentos saudáveis, isentos de resíduos e contaminantes químicos. Por esta razão, a agricultura orgânica tornou-se um mercado em expansão, que atende às exigências dos consumidores que procuram produtos de melhor qualidade e que se preocupam com as questões ligadas à saúde e ao meio ambiente.

No mercado mundial, existe uma crescente demanda por produtos orgânicos. No ano de 2006, o mercado de produtos orgânicos cresceu quase 14%, o que representa cerca de 37 bilhões de dólares (Giovannucci & Villalobos, 2007). Os produtos orgânicos, além de manter a biodiversidade do ambiente, poupam a saúde dos trabalhadores e o preço obtido em sua comercialização é maior do que na do café convencional (Theodoro et al., 2002; Giovannucci & Villalobos, 2007; Letourneau & Bothwell, 2008).

A produção de café orgânico em Minas Gerais, geralmente, é feita por pequenos proprietários rurais, que se unem em cooperativas, para comercializar os produtos. Mesmo havendo uma crescente demanda pela agricultura orgânica, ainda não existem informações de pesquisas suficientes sobre este assunto (Bettiol et al., 2002). Por esta razão, este estudo foi realizado com o objetivo de analisar a biodiversidade de fungos filamentosos

em grãos de café beneficiados, produzidos de forma tradicional e orgânica no município de Poço Fundo, MG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Quinze amostras de grãos de café orgânico e convencional foram analisadas neste experimento. As amostras examinadas foram obtidas na cidade de Poço Fundo que se situa a 21° 46' de latitude sul e 45° 57' de longitude oeste. Possui área de 475 Km², clima tropical-temperado, temperatura média anual de 20°C, precipitação média anual de 1592,7 mm e altitude máxima de 1435m.

Na tabela 1, é possível observar o número de amostras de grãos de café de cultivo orgânico e convencional.

TABELA 1 Localização e número de amostras de grãos de café de cultivo orgânico e convencional do município de Poço Fundo.

Município	Cultivo	Tipo	Número de amostras
Poço Fundo	Orgânico	Varrição	3
Poço Fundo	Orgânico	Pano	5
Poço Fundo	Convencional	Varrição	3
Poço Fundo	Convencional	Pano	4

A purificação e a identificação dos fungos em âmbito de espécie ocorreram no Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

4.2 Isolamento dos fungos filamentosos

Para o isolamento dos fungos associados aos grãos de café beneficiado, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto, conforme Sansom et al. (2004).

De cada amostra foram coletados 200 grãos ao acaso, sendo 100 grãos com desinfecção superficial e 100 grãos sem desinfecção superficial.

Foi realizada uma desinfestação com hipoclorito de sódio a 1%, visando à identificação dos fungos presentes no interior dos grãos.

Durante o processo de desinfestação, inicialmente, foi feita uma imersão das amostras em álcool 70% para se fazer uma primeira desinfecção superficial e diminuir a tensão superficial do grão, permitindo o melhor contato entre a solução de hipoclorito e os grãos. Depois, as amostras foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 segundos, sendo utilizada uma solução de hipoclorito para cada amostra analisada. E, como último passo da desinfecção, as amostras de café foram lavadas com água destilada e esterilizada, com a finalidade de retirar resíduos de hipoclorito de sódio.

Após a desinfestação, os 100 grãos foram transferidos assepticamente para as placas de Petri contendo meio de cultura dicloram rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (glicose 10g, peptona bacteriológica 5g; KH_2PO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; ágar 15g; água destilada 1L; rosa de bengala 25mg, dicloran 2mg; cloranfenicol 100g). Em cada placa foram colocados 25 grãos de cada amostra, os quais foram incubados a 25°C, por 7 dias. A contaminação dos grãos foi expressa em porcentagem de grãos contaminados.

O isolamento dos fungos foi realizado com o auxílio de palitos de madeira esterilizados em autoclave (20 minutos, a 121°C), transferindo-os com um leve toque na cabeça conidial dos fungos, que cresceram na superfície do grão, para uma placa de Petri contendo malt extract ágar (MA-extrato de malte 20g, ágar 20g e água destilada 1L), os quais foram repicados sucessivamente, até a obtenção de culturas puras.

4.3 Identificação de espécies do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Após o isolamento feito em MA, as colônias dos fungos apresentam características morfológicas que possibilitam fazer um direcionamento dos meios de cultura que devem ser utilizados de acordo com o provável gênero. Os isolados do gênero *Aspergillus* foram incubados em czapek yeast agar

(CYA) (K_2HPO_4 1,0g; concentrado de Czapek 10.0 mL; extrato de levedura 5,0g; ágar 15,0g; água destilada 1 L; concentrado Czapek $NaNO_3$ 30g; KCl 5,0g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5,0g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,05g, água destilada 100ml) e MEA (extrato de malte 20,0g; peptona 1,0g; glucose 30,0g; ágar 20g; água destilada 1 L) a 25°C e a 37°C e, após 7 dias de incubação, foram observadas as características microscópicas e macroscópicas descritas por Klich (2002).

As características macroscópicas foram: coloração e diâmetro das colônias, presença ou ausência e coloração dos escleródios e coloração no reverso, em todos os meios de cultura. As características microscópicas foram: o arranjo entre métulas e fiáldes ligadas à vesícula, comprimento do conidióforo, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiáldes, textura dos conídios e do conidióforo.

Os isolados de *Aspergillus* foram identificados conforme Klich (2002) e as espécies de *Penicillium* de acordo com Pitt (2000), sendo essas identificações amparadas por Pitt & Hocking (1997) e Samson et al. (2000).

4.3.1 Identificação das espécies do gênero *Fusarium* sp.

Após a purificação dos isolados, a identificação foi realizada de acordo com Nelson et al. (1983). Os fungos foram inoculados em placas contendo meio de SNA (KH_2PO_4 1g; KNO_3 1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; KCl 0,5g; glicose 0,2g; sacarose 0,2g; ágar 20g e água destilada 1L) e MA, para analisar as características microscópicas e em BDA para observar a coloração das colônias. As placas foram mantidas em BOD com fotoperíodo, a 21°C, por 10 dias.

4.3.2 Identificação das espécies dos gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium* e *Trichoderma*

Os isolados destes gêneros foram cultivados em extrato de malte (MEA), a 25°C, por 7 dias e a identificação seguiu o protocolo de Samson et al. (2000).

4.3.3 Identificação das espécies dos gêneros *Colleototrichum*, *Glomerella*, *Bipolaris* e *Epicoccum*

Os isolados destes gêneros foram cultivados em malt extract ágar (MA), a 25°C, por 7 dias e a identificação desses fungos foi realizado de acordo com Ellis (1971).

4.3.4 Identificação das espécies dos gêneros *Phoma* e *Alternaria*

Os fungos que pertencem a estes gêneros foram inoculados em oatmeal agar (AO) CBS (aveia 30g, água destilada 1L, ágar 15g), por sete dias, à temperatura de 25°C e foram identificados conforme Ellis (1971).

4.4 Análises estatísticas

A metodologia estatística utilizada neste trabalho consistiu na construção de um intervalo de confiança de 95% para o desvio padrão, com a finalidade de inferir a dispersão da ocorrência de fungos filamentosos nas amostras de café orgânico e convencional. Posteriormente, com o propósito de identificar as relações entre as espécies toxigênicas e não toxigênicas, por meio da formação de agrupamentos, utilizou-se a técnica de correspondência simples, conforme a metodologia descrita por Guedes et al. (1999).

4.5 Cálculo dos índices de biodiversidade

Para avaliar a diversidade das colônias fúngicas dos grãos de café de cultivo orgânico e convencional, foram utilizados os seguintes índices:

1) Índice de riqueza de Margalef (Rm): estima o número de espécies levando-se em conta o número total de indivíduos. O índice é dado por:

$$R_m = (S - 1) / (\ln n)$$

em que S é o número de espécies e n é o número de indivíduos identificados.

2) Índice de diversidade de Shannon-Weiner (H'): leva em conta a riqueza e o número de indivíduos de cada espécie, sendo comumente utilizado em estudos de ecologia de comunidades (Magurran, 1988).

$$H' = - \sum (p_i \cdot \ln p_i)$$

em que p_i é a proporção de indivíduos de cada espécie i em relação ao número total de indivíduos.

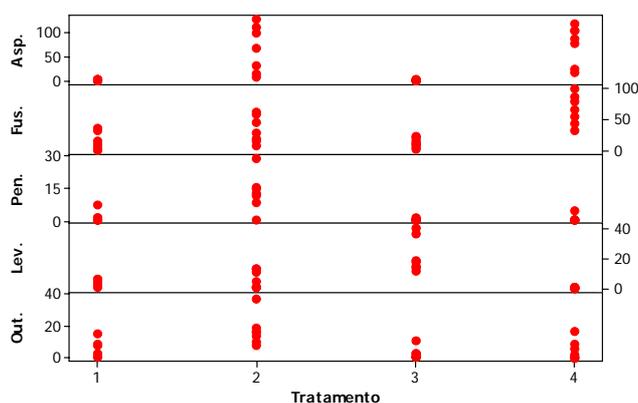
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento da microbiota fúngica

Foram detectados, nas amostras de grãos de café orgânico e convencional, 212 isolados fúngicos. Esses isolados pertencem a 11 diferentes gêneros, predominando *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Figura 1). Estes resultados estão próximos dos obtidos em estudos de biodiversidade de fungos filamentosos em grãos de café (Silva et al., 2000; Joosten et al., 2001; Pasin et al., 2002; Pereira, 2002; Pimenta & Vilela et al., 2003; Batista et al., 2003; Batista et al., 2007; Silva et al., 2008; Visotto et al., 2008).

A presença desses fungos no café orgânico e convencional é prejudicial, pois os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais frequentemente associados com a produção de micotoxinas (Yiannikouris & Jouany, 2002; Sidhu, 2002).

O índice de contaminação corresponde à ocorrência de fungos filamentosos nos grãos de café de cultivo orgânico e convencional pode ser analisado na Figura 1.



Out: Outros, Lev: Levedura, Pen: *Penicillium*, Fus: *Fusarium*, Asp: *Aspergillus*
1) Café orgânico com desinfecção; 2) Café orgânico sem desinfecção; 3) Café convencional com desinfecção e 4) Café convencional sem desinfecção

FIGURA 1 Contagem de fungos filamentosos isolados nos grãos de café.

Além dos fungos predominantes, a presença de *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Colleototrichum*, *Gliocladium*, *Epicoccum* e *Alternaria* também foi constatada.

A maior parte dos gêneros identificados neste estudo já tinha sido confirmada em amostras de café convencional, no Brasil (Taniwaki et al., 2003; Silva et al., 2000; Urbano et al., 20001; Pereira, 2002; Batista et al., 2003). No entanto, não existem registros bibliográficos sobre a incidência de fungos filamentosos no café orgânico. Portanto, os fungos *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sulphureus*, *A. versicolor*, *C. cladosporioides*, *C. gloesporioides*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *Gliocladium* sp., *Mucor hiemalis*, *P. brevicompactum*, *P. hirsutum*, *P. solitum* e *T. harzianum* são os primeiros encontrados em grãos de café orgânico neste país. A diversidade de fungos é importante para estimar o papel funcional dos fungos nos ecossistemas e, assim, explorar economicamente estes microrganismos.

Todas as amostras estudadas apresentaram contaminações por espécies de fungos. No entanto, quando se realizou a desinfecção da superfície dos grãos, houve redução do índice de contaminação por fungos filamentosos e maior presença de fungos leveduriformes.

Analisando o intervalo de 95% de confiança para o desvio padrão (Figura 2), é possível afirmar que a contaminação com fungos filamentosos tem uma maior dispersão nas amostras de café orgânico.

A interpretação da Figura 2 refere-se à dispersão (homogeneidade) ou (heterogeneidade) entre as amostras de café orgânico e convencional.

A análise da variabilidade da frequência dos fungos em relação à média das observações para cada tratamento pode ser observada na Figura 2.

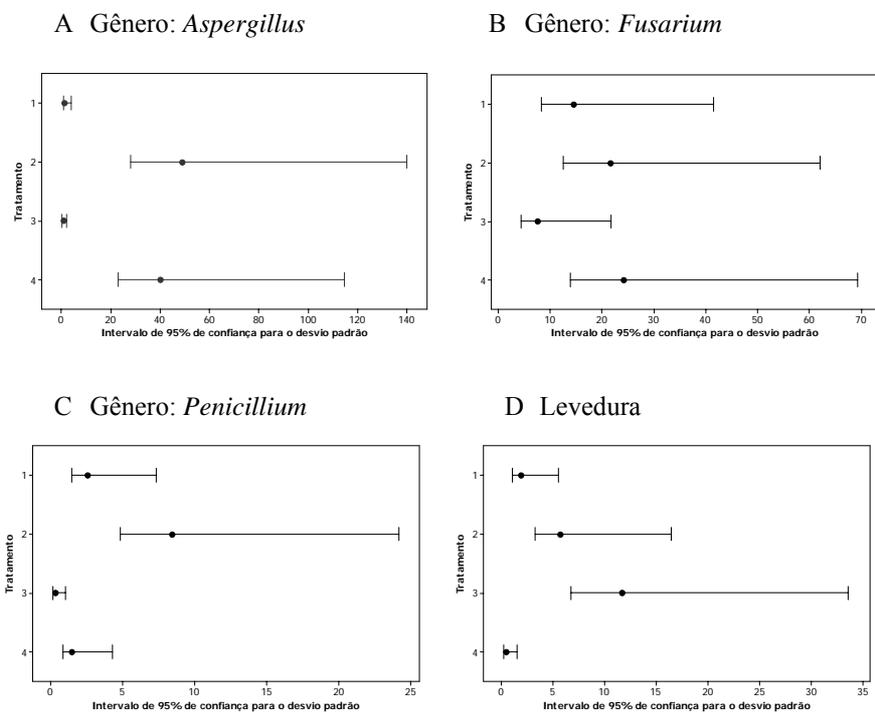


FIGURA 2 Análise da dispersão de fungos filamentosos nas amostras de café de cultivo orgânico e convencional (Tratamento 1: café orgânico com desinfecção, 2: café orgânico sem desinfecção, 3: café convencional com desinfecção e 4: café convencional sem desinfecção).

Estes resultados demonstram que, nos grãos de café cultivados sob sistema orgânico e convencional, os principais gêneros de fungos encontrados foram *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo estes gêneros os principais responsáveis pela contaminação dos grãos de café em diversos estudos, como os realizados por Batista et al. (2003), Batista & Chalfoun (2007), Silva et al. (2008) e Visotto et al. (2008). Além dos fungos filamentosos, as amostras de café convencional que passaram pelo processo de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1% apresentaram alto nível de infecção com leveduras. Similarmente, Urbano et al. (2001) encontraram 100% de contaminação por leveduras e fungos em amostras de grãos de café analisadas em diferentes estágios de maturação e processamento.

Os tratamentos 1 e 3 (Figura 2) tiveram uma redução significativa de contaminação com fungos filamentosos. Isso ocorreu porque a desinfecção das amostras de café eliminou a maioria dos fungos presentes no exterior dos grãos.

As amostras de café que não foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1% tiveram o maior índice de contaminação, conforme mostrado na Figura 2. Os grupamentos 2 e 4 apresentaram maior variabilidade. Supostamente, uma das amostras que resultaram em resposta discrepante em relação a média pode ser explicada pela ocorrência de fungos. No entanto, após o processo de desinfestação dos grãos, ocorreu uma redução significativa do índice de contaminação. Noonim et al. (2008) demonstraram que, após o método de desinfestação, a contaminação dos grãos de café reduziu de 98% para 60%.

O gênero *Aspergillus* foi responsável pela contaminação da maioria das amostras de grãos de café cultivados de forma orgânica e convencional (Figura 1). Portanto, *Aspergillus* foi o gênero predominante, com aproximadamente 34,43% dos grãos contaminados por espécies da Seção *Circundati*, *Nigri*, *Flavi* e *Versicolor* (Tabela 2).

A metodologia utilizada neste trabalho (plaqueamento direto e indireto usando o meio DRBC) foi satisfatória devido à diversidade de fungos filamentosos isolada das amostras (Tabela 1). Suarez-Quirós (2004) relata que não conseguiu isolar nenhum fungo produtor de toxina, pois utilizou a técnica do plaqueamento direto com DG18 e obteve resultado negativo. Portanto, a escolha da metodologia é fundamental para se obter um resultado positivo, principalmente se pretende avaliar a biodiversidade dos fungos.

Na Figura 2(A), é possível observar que os isolados do gênero *Aspergillus* foram encontrados em maior abundância nas amostras de café orgânico que não passaram pelo processo de desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%. Isso indica que as espécies pertencentes a esses gêneros contaminam principalmente o exterior dos grãos de café. Os isolados de

Aspergillus apresentam ampla distribuição e, geralmente, estão relacionados com o solo e a vegetação (Klich, 2002).

A presença destas espécies no café é preocupante, pois esses microrganismos têm a capacidade de produzir micotoxinas. A ocratoxina A presente em amostras de café tem sido atribuída à presença, principalmente, de espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes às Seções *Circumdati* e *Nigri* (Urbano et al., 2001; Batista et al., 2003).

Para a cafeicultura, a saúde da lavoura é essencial para a redução de risco da presença de micotoxinas. Conseqüentemente, a presença de fitopatógenos pode favorecer o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos que, na maioria das vezes, são oportunistas (Fischer, 2007).

Recentemente, tem-se sugerido que os alimentos orgânicos seriam mais propensos à contaminação por micotoxinas do que os alimentos convencionais, pois não são tratados da mesma forma com agentes antifúngicos (Khouba, 2003). No entanto, ainda não existem evidências de que os alimentos especiais sejam mais propensos à contaminação por micotoxinas do que os convencionais (FAO, 2000).

Vários fatores estão envolvidos na cafeicultura orgânica e convencional e que podem favorecer ou não o desenvolvimento de espécies toxigênicas. A biodiversidade microbiana é um deles, ora podendo impedir a produção de micotoxinas, degradando a toxina em meio natural ou, até mesmo, favorecendo, devido à formação de um ambiente competitivo. Se o uso de pesticidas pode selecionar patógenos resistentes que favorecem a infecção de fungos micotoxigênicos, os fungicidas podem também controlar os fungos produtores de micotoxinas.

Em relação ao fungo *Fusarium* na Figura 2(B) observa-se que as amostras que foram submetidas aos tratamentos 2 e 4 revelaram uma maior variabilidade. De maneira suposta, uma das amostras que resultaram em resposta discrepante em relação a média pode ser explicada pela ocorrência de fungos. Os isolados de *Fusarium* contaminaram principalmente as amostras que não foram desinfetadas. No entanto, eles também foram

encontrados em abundância nas outras análises. De acordo com Pfenning & Martins (2005), as espécies de *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. equiseti* e *F. stilboides* foram encontradas em raízes, folhas, galhos e tronco de plantas de café com sintomas de murcha.

Na Figura 2(C) é possível observar que os tratamentos 1 e 2 apresentaram uma maior variabilidade quando comparados aos outros tratamentos. A contaminação das amostras com os isolados de *Penicillium* foi significativamente maior nos grãos orgânicos que não sofreram o processo de desinfecção. As amostras de café convencional tiveram uma pequena porcentagem de contaminação, principalmente das análises que foram desinfetadas. Segundo Chalfoun et al. (2003) as espécies de *P. variable*, *P. citrinum* e *P. minioluteum* foram as espécies de *Penicillium* mais encontradas nos grãos de café orgânico. Estas espécies não são produtoras de micotoxinas. A presença deste gênero no café pode ser considerada positiva, uma vez que vários trabalhos indicam que ele é um potencial solubilizador de fosfato.

5.2 Biodiversidade de fungos no café orgânico e convencional

Das quinze amostras de grãos de café analisadas, foram obtidos 212 isolados fúngicos, sendo 23 espécies pertencentes a 11 gêneros. As principais espécies encontradas nas amostras de café de cultivo orgânico e convencional podem ser observadas na Tabela 2.

TABELA 2 Biodiversidade de fungos isolados de grãos de café orgânico e convencional (Com desin.: com desinfecção, Sem desin.: sem desinfecção)

Espécies	CONVENCIONAL				ORGÂNICO			
	PANO		VARRIÇÃO		PANO		VARRIÇÃO	
	Com desin.	Sem desin.	Com desin.	Sem desin.	Com desin.	Sem desin.	Com desin.	Sem desin.
<i>Alternaria</i>								
<i>A. alternata</i>	6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i>								
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	7	6	4	2
<i>A. foetidus</i>	-	-	-	-	-	9	-	3
<i>A. niger</i>	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ochraceus</i>	-	-	-	-	5	14	-	4
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>A. sulphureus</i>	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>A. tubingensis</i>	-	5	-	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	-	3	-	-
<i>Cladosporium</i>								
<i>C. cladosporioides</i>	4	-	-	3	5	5	-	-
<i>Colleotrichum</i>								
<i>C. gloesporioides</i>	-	-	-	-	3	4	-	-
<i>Epicoccum</i>								
<i>E. purpurascens</i>	6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i>								
<i>F. oxysporum</i>	1	-	-	6	-	-	-	2
<i>F. semitectum</i>	-	5	-	8	-	-	-	8
<i>F. solani</i>		6						9
<i>Gliocladium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Mucor</i>								
<i>M. hiemalis</i>	-	-	-	-	4	-	-	7
<i>Penicillium</i>								
<i>P. brevicompactum</i>	8	11	-	-	1	11	-	-
<i>P. citrinum</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. hirsutum</i>	-	-	-	-	-	-	3	-
<i>P. solitum</i>	-	-	-	-	-	-	2	-
<i>Rhizopus</i>								
<i>R. stolonifer</i>	8	1	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i>								
<i>T. harzianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	4

Vinte e três espécies foram encontradas nas amostras de café cultivadas sob sistema orgânico e convencional. A espécie que apresentou o maior número de isolados foi *A. ochraceus* (28 isolados).

Os *Aspergillus* amarelos da Seção *Circundati* foram o grupo predominante, com 41,09% de contaminação (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*), seguido da Seção *Nigri* com 27,39% (*A. niger*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*), 27,39% da Seção *Flavi* (*A. flavus* e *A. oryzae*) e 4,1% da Seção *Versicolor* (*A. versicolor*). Conforme Klich (2002), as espécies do gênero *Aspergillus* apresentam ampla distribuição, sendo encontradas frequentemente em regiões quentes e sua distribuição está relacionada com o clima, a vegetação e o solo. Esta espécie também tem sido repetidamente associada aos grãos de café (Pimenta & Vilela, 2003; Chalfoun & Batista, 2003).

Batista et al. (2009) analisaram amostras de café processadas pela via seca e úmida e detectaram 80% de isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circundati*, em todas as fases de colheita e processamento.

Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram os que obtiveram o maior número de espécies. Oito espécies de *Aspergillus*, sendo *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. foetidus*, *A. versicolor*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sulphureus*, *A. tubingensis* e quatro espécies de *Penicillium*: *P. brevicompactum*, *P. hirsutum*, *P. citrinum* e *P. solitum*.

A presença de espécies de *Penicillium* em grãos de café beneficiado também foi evidenciada por Batista & Chalfoun (2007), que identificaram *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. minioluteum*, *P. variabile*, *P. expansum* e *P. corylophilum*, associadas a grãos de café coletados em 11 municípios da região do sul de Minas Gerais.

De acordo com Chalfoun & Batista (2003), as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são de ocorrência cosmopolita e estão entre os microrganismos mais abundantes e sucedidos, sendo normalmente associadas a grãos armazenados ou danificados.

Constatou-se, por meio do cálculo do índice de Margalef e do índice de Shannon, que as amostras de café orgânico têm maior riqueza de espécies e de biodiversidade.

Nas amostras de café orgânico, o índice de riqueza foi de 3,29, enquanto no café convencional foi de 2,26. Quanto ao índice de Shannon, as amostras orgânicas apresentaram $H' = 4,42$, no entanto, para o café convencional, o índice de biodiversidade foi menor, $H' = 2,91$.

Portanto, as amostras de café orgânico possuem maior biodiversidade quando comparadas as de café convencional. Estes resultados corroboram com os estudos realizados Oehl et al (2004) que observaram uma maior diversidade de espécies de fungos micorrízicos no sistema convencional.

Segundo Hyde (2001) uma maior diversidade de organismos no sistema orgânico mantém o equilíbrio biológico e proporciona menos problemas com doenças e pragas.

Nos últimos anos, vários trabalhos foram desenvolvidos sob sistemas de cultivo convencional e orgânico e os resultados têm mostrado aumentos no conteúdo de matéria orgânica, atividade e biomassa microbiana em solos manejados organicamente (Edmeades, 2003; Glover et al., 2000; Melero et al., 2005; Tu et al., 2006).

A redução da biodiversidade do solo é considerada negativa (Hendrix et al., 1990), pois, as alterações na diversidade biológica podem reduzir as fontes de alimentos, combustíveis, recursos medicinais ou genéticos (Chapin et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

. os principais gêneros de fungos encontrados nas amostras de grãos de café orgânico e convencional de Poço Fundo- MG foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*;

. foram identificados 212 isolados, sendo 23 espécies pertencentes a 11 gêneros que estão associados às amostras de café, nos dois sistemas de cultivo;

. as espécies de fungos encontradas no café orgânico do município de Poço Fundo foram: *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sulphureus*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colleotrichum gloesporioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. semitectum*, *Gliocladium sp.*, *M. hiemalis*, *P. hirsutum*, *P. solitum*, e *T. harzianum*; e no café convencional foram encontradas as seguintes espécies: *Alternaria alternata*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, e *R. histolonifer*;

. a riqueza e a biodiversidade de fungos filamentosos foi maior nas amostras de café orgânico do que nas amostras de café convencional.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 19-21, June 1999.
- ANDOW, D. A. Vegetational diversity and arthropod population response. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 561-586, Jan. 1991.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; SILVA, C. F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; SCHWAN, R. F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J. A. H.; LIGO, M. A. V.; MINEIRO, J. L. de C. Soil organisms in organic and conventional cropping systems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 565-572, jul. /set. 2002.
- CHALFOUN, S. M.; ANGÉLICA, C. L.; BATISTA, L. R.; PEREIRA, M. C. Predominância do gênero *Penicillium* em solo de cultivo de café pelo sistema orgânico. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2003, Brasília. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café, 2003. CD-ROM.
- CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos de café *Aspergillus* & *Penicillium***. Brasília: Embrapa, 2003. 69 p.
- CHAPIN, F. S.; ZAVALETA, E. S.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R. L.; VITOUSEK, P. M.; REYNOLDS, H. L.; HOOPER, D. U.; LAVOREL, S. Consequences of changing biodiversity. **Nature**, London, v. 405, p. 234-242, May 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2008/2009**. Brasília: Conab, 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos08.09.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2010.

EDMEADES, D. C. The long-term effects of manures and fertilisers on soil productivity and quality: a review. **Nutrients Cycling in Agroecosystem**, Boca Raton, v. 66, n. 2, p. 165- 180, June 2003.

ELLIS, M. B. *Dematiaceous hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Organic Food and Farming. **Myth and reality: organic vs non-organic, the facts**. Bristol House: The Soil Association, 2000. 32p.

GIOVANUCCI, D.; VILLALOBOS, A. **The state of organic coffee**. San Jose: CIMS, 2007.

GLOVER, J. D.; REGANOLD, J. P.; ANDREWS, P. K. Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. **Agriculture, Ecosystem & Environment**, Amsterdam, v. 80, n. 1/2, p. 29-45, Aug. 2000.

HENDRIX, P. F.; CROSSLEY, D. A.; TONY BLAIR, J. M.; COLEMAN, D. C. Biota soil biota as components of sustainable agroecosystems. In: EDWARDS, C. A.; LAL, R.; MADDEN, P.; MILLER, R. H.; HOUSE, G. (Ed.). **Sustainable agricultural systems**. Iowa: Soil Water Conservation Society, 1990. p. 637-654.

HYDE, K. D. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1514-1518, Feb. 2001.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauctures, 2002. 116 p.

KOUBA, M. Quality of organic animal products. **Livestock Production Science**, Washington, v. 80, n. 3, p. 33-40, Mar. 2003.

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 39-44, Apr. 2001.

LETOURNEAU, D. K.; BOTHWELL, S. G. Comparison of organic and conventional farms: challenging ecologists to make biodiversity functional. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, v. 6, n. 8, p. 430-438, Aug. 2008.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurements**. Sydney: Croom Helm, 1988. 179p.

MELERO, S.; PORRAS, J. C. R.; HERENCIA, J. F.; MADEJON, E. Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 90, n. 1/2, p. 162-170, Nov. 2005.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species an illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1983. 193p.

NOONIM, P.; AHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R.A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochatoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology od Food Microbiology**, London, v. 128, n. 2, p. 197-202, Dec. 2008.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; MADER, P.; DUBOIS, D.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. **Oecologia**, Berlin, v. 138, n. 4, p. 574-583, Mar. 2004.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S.; CHALFOUN, S. M.; PÁDUA, T. R. P. Efeito de micronutrientes a população fúngica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 918–926, nov./dez. 2002.

PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana e ocratoxina A no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1315-1320, nov./dez. 2003.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, Dec. 2000. Supplement.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 1, p. 45-61, Jan. 2004.

SIDHU, G. S. Mycotoxin genetics and gene clusters. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 705-711, Sept. 2002.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCWUAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous during fermentation drying and storage of coffee (*Coffea Arabica* L) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 238-240, jul./set. 2008.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* L in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept., 2000.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

THEODORO, V. C. de A.; GUIMARÃES, R. J.; MOURÃO JÚNIOR, M.; CHAGAS, S. J. de R. Alterações da qualidade de grãos de cafés (*C. arabica* L.) colhidos no pano e no chão, provenientes de sistemas de manejo orgânico, em conversão e convencional. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 27, pt. 4, p. 38-44, jul. 2002. Especial Café.

TU, C.; RISTAINO, J. B.; HU, S. Soil microbial biomass and activity in organic tomato farming systems: effects of organic inputs and straw mulching. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 38, n. 2, p. 247-255, Feb. 2006

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. E.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

VISOTTO, L. E.; COSTA, M. D.; COELHO, J. L. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; MENDES, F. Q. Isolamento de fungos toxigênicos em grãos de café (*Coffea arabica* L.) e avaliação da produção *in vitro* de ocratoxina A. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 32, pt. 10, p. 11-16, jul. 2001. Especial Café.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review **Animal Research**, Tubingen, v. 51, n. 2, p. 81-99, Mar./Apr. 2002.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo <i>A. flavus</i>	78
TABELA 2 Coordenadas e contribuições de <i>A. flavus</i> e outros fungos no café orgânico	78
TABELA 3 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo <i>A. ochraceus</i>	78
TABELA 4 Coordenadas e contribuições de <i>A. ochraceus</i> e outros fungos no café orgânico	78
TABELA 5 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo <i>A. flavus</i>	79
TABELA 6 Coordenadas e contribuições de <i>A. flavus</i> e outros fungos no café convencional	79
TABELA 7 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo <i>A. ochraceus</i>	79
TABELA 8 Coordenadas e contribuições de <i>A. ochraceus</i> e outros fungos no café convencional	79

TABELA 1 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo *A. flavus*.

Nome	Proporção	Componente 1		Componente 2	
		Coord.	Contr.	Coord.	Contr.
Amostra 1	0,324	-0,046	0,002	0,310	0,222
Amostra 2	0,216	0,980	0,668	-0,259	0,103
Amostra 3	0,230	-0,231	0,040	0,346	0,196
Amostra 4	0,230	-0,627	0,290	-0,540	0,478

TABELA 2 Coordenadas e contribuições de *A. flavus* e outros fungos no café orgânico.

Nome	Proporção	Componente 1		Componente 2	
		Coord.	Contr.	Coord.	Contri.
<i>P. brevicompactum</i>	0,135	0,195	0,017	-0,063	0,004
<i>A. foetidus</i>	0,216	0,730	0,371	-0,431	0,287
<i>F. equiseti</i>	0,108	1,298	0,586	-0,311	0,075
<i>Colleotrichum</i>	0,095	-0,225	0,015	0,869	0,510
<i>Cladosporium</i>	0,257	-0,044	0,002	0,255	0,119
<i>A. ochraceus</i>	0,189	0,125	0,010	-0,065	0,006

TABELA 3 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo *A. ochraceus*.

Nome	Proporção	Componente 1		Componente 2	
		Coord.	Contri.	Coord.	Contri.
Amostra 1	0,340	0,452	0,486	0,024	0,004
Amostra 2	0,319	-0,295	0,194	0,272	0,463
Amostra 3	0,128	-0,592	0,312	-0,340	0,290
Amostra 4	0,213	0,074	0,008	-0,241	0,243

TABELA 4 Coordenadas e contribuições de *A. ochraceus* e outros fungos no café orgânico.

Nome	Proporção	Componente 1		Componente 2	
		Coord.	Contri.	Coord.	Contri.
Amostra 1	0,245	1,020	0,412	0,471	0,337
Amostra 2	0,226	-0,206	0,016	-0,138	0,027
Amostra 3	0,264	-1,107	0,524	0,251	0,103
Amostra 4	0,264	0,337	0,049	-0,570	0,533

TABELA 5 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo *Aspergillus flavus*

Nome	Componente 1		Componente 2		
	Proporção	Coord.	Contri.	Coord.	Contri.
<i>P. brevicompactum</i>	0,213	-0,052	0,004	-0,350	0,512
<i>A. flavus</i>	0,085	-0,238	0,034	-0,317	0,168
<i>A. foetidus</i>	0,404	-0,334	0,315	0,186	0,274
<i>Cladosporium</i>	0,298	0,558	0,648	0,089	0,046

TABELA 6 Coordenadas e contribuições *Aspergillus flavus* e outros fungos no café convencional

Nome	Componente 1		Componente 2		
	Proporção	Coord.	Contri.	Coord.	Contri.
<i>P. brevicompactum</i>	0,113	0,517	0,049	0,415	0,121
<i>A. niger</i>	0,189	1,036	0,328	0,395	0,183
<i>Rhizopus</i>	0,208	0,540	0,098	-0,517	0,344
<i>A. ochraceus</i>	0,189	-0,697	0,148	-0,074	0,006
<i>F. oxysporum</i>	0,132	-1,244	0,331	0,487	0,194
<i>Cladosporium</i>	0,170	-0,414	0,047	-0,379	0,152

TABELA 7 Coordenadas e contribuições das amostras com o fungo *Aspergillus ochraceus*

Nome	Componente 1		Componente 2		
	Proporção	Coord.	Contri.	Coord.	Contri.
Amostra 1	0,313	0,049	0,001	-0,461	0,642
Amostra 2	0,281	-1,042	0,587	0,215	0,126
Amostra 3	0,031	-0,170	0,002	-0,242	0,018
Amostra 4	0,375	0,754	0,410	0,243	0,214

TABELA 8 Coordenadas e contribuições de *Aspergillus ochraceus* e outros fungos no café convencional

Nome	Proporção	Componente 1		Componente 2	
		Coord.	Contri.	Coord.	Contri.
<i>Rhizopus</i>	0,250	-1,066	0,546	0,143	0,049
<i>F. oxysporum</i>	0,219	0,906	0,345	0,443	0,415
<i>Cladosporium</i>	0,313	-0,123	0,009	-0,078	0,018
<i>A. flavus</i>	0,219	0,487	0,100	-0,495	0,518